

540,025

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年7月15日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/058958 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/02, C12Q 1/54

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016603

(22) 国際出願日: 2003年12月24日 (24.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-373297  
2002年12月24日 (24.12.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 池田食研株式会社 (IKEDA FOOD RESEARCH CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒721-0956 広島県 福山市 箕沖町 9 5 番地 7  
Hiroshima (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小村 啓悟 (OMURA, Hironori) [JP/JP]; 〒721-0956 広島県 福山市 箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP). 眞田 浩一 (SANADA, Hirokazu) [JP/JP]; 〒721-0956 広島県 福山市 箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP). 矢田 貴子 (YADA, Takako) [JP/JP]; 〒721-0956 広島県 福山市 箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP). 森田 哲成 (MORITA, Tetsunari) [JP/JP]; 〒721-0956 広島県 福山市 箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP). 久山 美加 (KUYAMA, Mika) [JP/JP]; 〒721-0956 広島県 福山市 箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内 Hiroshima (JP). 池田 篤治 (IKEDA, Tokuji)

[JP/JP]; 〒606-0081 京都府 京都市 左京区 上高野畑町 1 0-5 Kyoto (JP). 加納 健司 (KANO, Kenji) [JP/JP]; 〒603-8116 京都府 京都市 北区 紫竹上本町 4 0-1 Kyoto (JP). 辻村 清也 (TSUJIMURA, Selya) [JP/JP]; 〒638-0221 奈良県 吉野郡 黒滝村 中戸 7 8 1 Nara (JP).

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都 港区 南青山 6 丁目 1 1 番 1 号 スリーエフ南青山ビルディング 7 F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COENZYME-BINDING GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: 補酵素結合型グルコース脱水素酵素

(57) Abstract: It is intended to provide a microorganism-origin and soluble coenzyme-binding glucose dehydrogenase which catalyzes a reaction of oxidizing glucose in the presence of an electron receptor, acts on maltose only at a low ratio of 5% or less and is inhibited by 1,10-phenanthroline. It is also intended to provide a process for producing the coenzyme-binding glucose dehydrogenase and a measurement method and a measurement reagent with the use of the coenzyme-binding glucose dehydrogenase. Thus, it becomes possible to apply the coenzyme-binding glucose dehydrogenase to industrial purposes. Moreover, the coenzyme-binding glucose dehydrogenase is usable in producing and analyzing substances including, for example, a method of measuring glucose in a sample, a method of removing the same and a process for producing an organic compound. Also, it becomes possible to provide a glucose sensor whereby blood glucose level can be accurately measured. That is to say, it becomes possible to provide a highly useful enzyme which is usable in modifying and processing materials in the fields of pharmacology, clinical medicine and food industry.

(57) 要約: 本発明は電子受容体存在下でグルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が5%以下と低く、1,10-フェナントロリンで阻害される微生物由来の可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を提供する。さらに、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法および該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した測定方法ならびに測定試薬を提供する。本発明により補酵素結合型グルコース脱水素酵素の産業的用途への応用が可能となり、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した試料中のグルコースの測定方法、消去方法、有機化合物の製造方法などを含む物質生産および分析の用途において使用が可能となる。また、血糖値を正確に測定可能なグルコースセンサを提供可能となった。よって、医薬、臨床分野および食品分野での素材の改質加工に使用可能であるなど、利用価値の高い酵素の提供が可能となった。

WO 2004/058958 A1

## 明細書

## 補酵素結合型グルコース脱水素酵素

5

## 技術分野

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素、該補酵素結合型  
10 グルコース脱水素酵素の製造方法、および該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の  
生産能を有する微生物に関する。

また、本発明は試料中のグルコースの測定に際し、該補酵素結合型グルコース脱  
水素酵素を使用した測定方法、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有する試  
15 薬および試薬組成物に関する。さらには有機化合物の製造方法などを含む製造原料  
などの物質生産および分析の用途に関する。

さらに、本発明は試料中の特定成分を迅速かつ簡便に高精度で定量することがで  
きるバイオセンサに関する。具体的には、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を  
20 使用したグルコースセンサに関する。

## 背景技術

25 グルコースは血液中に存在し、糖尿病の重要なマーカーとして利用されている。  
グルコース測定法としては、従来から化学法と酵素法が存在するが、一般的に特異  
性、安全性の面で酵素法が優れているとされている。酵素法としては、グルコース  
オキシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素あるいは NAD (P) 依存性グルコース  
脱水素酵素を使用した測定法がある。しかし、グルコースオキシダーゼあるいはグ  
30 ルコース-6-リン酸脱水素酵素を使用した測定法は、複数の酵素を使用するため簡

便な反応系ではない。また、このグルコース-6-リン酸脱水素酵素を使用したおよび NAD (P) 依存性グルコース脱水素酵素を使用した測定法では反応系に補酵素である NAD (P) を添加しなければならないという煩雑性があった。

- 5 近年、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量する方式として、様々なバイオセンサが提案されている。例えば、バイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷などの方法で作用極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体を含む酵素反応層を形成したものなどがある。

10

糖尿病患者が年々増加しており、病院のみならず在宅でも利用可能でかつ簡便な血糖の測定方法および血糖値の管理手段が求められている。現在、血糖測定用として、簡易型のグルコースセンサが使用されているが、こうしたセンサに広く使用されているグルコースオキシダーゼは、溶存酸素濃度によって測定値に誤差が生じる可能性が高い。また、ニコチンアミド系補酵素依存性のグルコース脱水素酵素を用いたバイオセンサは、バックグラウンドのノイズが高く、補酵素や補助酵素などを別途添加する必要があるため反応系が複雑であり、さらに発色系による測定の場合は高価な光学系を必要とするなどの欠点がある。

15

- 20 溶存酸素濃度の影響を受けず、かつ NAD (P) 非存在下においてグルコースに作用する酵素として、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素が知られているが、該ピロロキノリンキノンは酵素と解離しやすいという問題点があった。さらに、特開 2000-350588 号公報および特開 2001-197888 号公報において開示されたピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素は、グルコース  
25 に対する選択性が低いという欠点があった。一方、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素 (特開平 10-243786 号公報)、シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) 由来ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素 (*Agric. Biol. Chem.* (1980) 44:1505-1512)、およびグルコノバクター・サブオキシダンス (*Gluconobacter suboxydans*) 由来ピロロキノ  
30 リンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素

(Agric. Biol. Chem. (1981) 45:851-861) のマルトースに対する作用性は、それぞれ 3%、3.2%、5%であるが、菌体の膜画分に存在しているため、可溶化による酵素の抽出操作が必要という煩雑性があった。

- 5      また、グルコースの 3 位の水酸基を酸化する補酵素結合型グルコース-3-脱水素酵素が、J. Biol. Chem. (1967) 242 : 3665-3672、Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 51 : 58-64、Appl. Biochem. Biotechnol. (1996) 56 : 301-310 および Enzyme Microb. Technol. (1998) 22 : 269-274 で報告されているが、いずれもグルコースに対する選択性が低い。マルトースは輸液成分として広く使用されており、  
10   輸液を投与した患者の血中マルトース濃度は高いため、グルコースに特異的に作用し、特にマルトースへの作用性が低い血糖測定用酵素の開発が望まれていた。

- 本発明は、上に述べた産業上の要請に応えるため、グルコースに対する基質認識性に優れ、マルトースに対する作用性の低い、新規なグルコース脱水素酵素を提供すること、その製造方法および生産能をもつ微生物を提供することを課題としてい  
15   る。

- また、本発明は新規なグルコース脱水素酵素を利用したグルコースを迅速かつ簡便に高精度で定量可能な優れたグルコース測定方法、測定試薬およびバイオセンサ、さらにはグルコース消去試薬を提供することを課題としている。

20

### 発明の開示

- 本発明は前記課題を解決するためになされたものであって、本発明者らは、各方面から検討した結果、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素に着目し  
25   た。該補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、電子受容体存在下でグルコースを酸化する反応を触媒し、例えば、EC (酵素番号) 1. 1. 99 に分類される酵素である。さらに、本発明者らは、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生産する各種微生物を鋭意検索した結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産微生物および補酵素結合型グルコース脱水素酵素を見出した。

30

本発明は、触媒反応時において補酵素が常に結合したグルコース脱水素酵素を提供する。該補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、電子受容体存在下で、グルコース、特にグルコースの1位の水酸基を酸化する反応を触媒するという理化学的性質をもつ。該補酵素結合型グルコース脱水素酵素はマルトースへの作用性が5%以下、  
5 好ましくは3%以下であり、マルトースへの作用性が低い。また、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素は1,10-フェナントロリンで酵素反応が阻害される性質を有し、終濃度5mMの1,10-フェナントロリンで50%以上阻害され、好ましくは2mM 1,10-フェナントロリンで50%以上阻害され、より好ましくは1mM 1,10-フェナントロリンで50%以上阻害される。また、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素は50mM  
10 クエン酸・ナトリウム緩衝液(pH5.5)存在下において、50℃で15分の熱処理後も85%以上の残存酵素活性を有する。本発明のグルコース脱水素酵素に結合する補酵素は、例えばフラビン化合物であればよく、例えばフラビンアデニンジヌクレオチドなどの補酵素である。また、本発明は、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の性質および/または実質的に同等な性質を有するタンパク質またはその塩について、  
15 該タンパク質をコードするアミノ酸配列あるいは当該配列に1またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、置換もしくは付加による変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的に活性で安定なタンパク質を含む。さらに、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、微生物由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素であり、好ましくは真核微生物由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素、より好ましくは寄託  
20 菌株 FERM BP-08578 由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素である。

現在までにアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) の細胞質画分および培養液中に、フラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素とするグルコース脱水素酵素の存在が確認されている (TCHAN-GI BAK (BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA  
25 ACTA. (1967) 139:277-293))。しかし、該グルコース脱水素酵素は重金属イオンのみで阻害され、1,10-フェナントロリンを含む金属キレーターで阻害されないという特徴の理化学的性質を有する。そのため、該グルコース脱水素酵素を使用した測定系における反応停止試薬として重金属以外は使用できず、反応停止後の重金属廃液の処理が煩雑であるといった問題を有している。またこの酵素は安定性が低く、実  
30 用性に難が有る。一方、本発明で見出した補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、

その特徴として、従来知られていたアスペルギルス・オリゼ由来補酵素結合型グルコース脱水素酵素に比べて安定性が高く、また重金属イオンの他、微量の 1, 10-フェナントロリンで阻害されるため反応停止などの作業が簡便という性質を有している。

5

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法を提供する。

10 本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素生産能を有する微生物を提供する。該微生物は好ましくは真核微生物であり、より好ましくはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属、さらに好ましくはアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) であり、最も好ましくは寄託菌株 FERM BP-08578 である。

15 本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した方法を提供する。好ましくは試料中のグルコースの測定に際し、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用したグルコースの測定方法である。補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用したグルコースの消去方法および有機化合物の製造方法である。

20 本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有する試薬を提供する。該試薬は、好ましくは試料中のグルコースの測定に用いる該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有するグルコースの測定試薬、および補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有するグルコースの消去試薬および有機化合物の製造試薬である。

25 本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有する試薬組成物を提供する。該組成物は、好ましくは試料中のグルコースの測定に用いる該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有するグルコースの測定組成物、補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有するグルコースの消去組成物および有機化合物の製造用原料である。

30

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用するバイオセンサを提供し、試料中の特定成分を定量および/または定性可能なバイオセンサを提供する。該バイオセンサは、好ましくは、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用したグルコースセンサである。

5

これら本発明の提供する測定方法、測定試薬、測定化合物、バイオセンサのひとつの好ましい態様は、かかる測定反応系にフェリシアン化カリウム（ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム）を終濃度 2mM-500mM で用いることを特徴とするものである。

- 10 本発明において、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の「マルトースに対する作用性」、「マルトースへの作用性」およびこれに類似する表現で「作用性」として表示される値(%)は、該酵素のグルコースに対する酵素活性を 100%とし、そのマルトースもしくは作用性の対象とされる物質に対する該活性の相対強度を百分率で表した数値である。

15

#### 図面の簡単な説明

- 20 図 1 は、実施例 3 (3.2) の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の相対活性(%)と pH との関係を示した図である。記号は測定値および緩衝液の種類を示し、緩衝液はそれぞれ、□クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.6~6.2)、◆リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8~7.2)、○トリス・塩酸緩衝液 (pH7.8~8.6) および▲グリシン・水酸化ナトリウム (pH9.2~9.5) である。該酵素の至適 pH は pH 7.0~9.0 であった。

- 25 図 2 は、実施例 3 (3.3) の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の残存活性(%)と pH との関係を示した図である。記号は測定値および緩衝液の種類を示し、緩衝液はそれぞれ、□クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.2~6.4)、◆リン酸カリウム緩衝液 (pH6.3~6.9)、○トリス・塩酸緩衝液 (pH7.3~8.6) および▲グリシン・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH9.1~11.4) である。該酵素の安定 pH は pH 4.5~8.5 であった。

- 30 図 3 は、実施例 3 (3.4) の補酵素結合型グルコース脱水素酵素相対活性(%)と温度

との関係を示した図である。該酵素の至適温度は、55℃付近であった。

図 4 は、実施例 3 (3.5) の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の熱処理後の残存活性 (%) と処理温度との関係を示した図である。酵素は約 50℃以下で安定であることが示された。

図 5 は、実施例 4 のグルコース定量のための検量線で、DCIP 吸光度変化－グルコース濃度を示す。

10 図 6 は、実施例 5 の補酵素結合型グルコース脱水素酵素固定化電極でのグルコース定量の検量線である。記号はそれぞれ、×はアルゴン飽和、△は酸素飽和、○は空気飽和条件下を示す。

15

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、例えば、EC 1.1.99 に分類される酵素であり、好ましくは EC 1.1.99.10、EC 1.1.99.13 もしくは EC 1.1.99.17 で示される酵素であればよく、補酵素結合型の酵素であり、好ましくは可溶性の補酵素結合型酵素である。つまり、酵素の抽出および/または精製過程で界面活性剤を使用することなく、水溶液の状態で取出し得る酵素である。ここでいう補酵素とは、フラビン化合物であればよく、フラビンアデニンジヌクレオチド、フラビンモノヌクレオチドなどが挙げられる。

20

25

30

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、触媒反応時において、補酵素が常に結合したグルコース脱水素酵素であればよい。該補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、少なくとも以下の性質を有する。電子受容体存在下でグルコースを酸化する反応を触媒し、特にグルコースの 1 位の水酸基を酸化する反応を触媒するという理化学的性質を有する。また、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素のマルトースへの作用性は低く、たとえば 5%以下、好ましくは 3%以下である。さらに、該補

酵素結合型グルコース脱水素酵素の酵素活性は終濃度 5mM 1, 10-フェナントロリンで 50%以上阻害され、好ましくは 2mM 1, 10-フェナントロリンで 50%以上阻害され、より好ましくは 1mM 1, 10-フェナントロリンで 50%以上、より最適には 1mM 1, 10-フェナントロリンで 60%以上阻害される。また、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素は 50mM クエン酸・ナトリウム緩衝液 (pH5. 5) 存在下において、50℃で 15 分の熱処理後も 85%以上の残存酵素活性率を有する。また、本発明は、上述する理化学的性質を有する補酵素結合型グルコース脱水素酵素に関し、または該補酵素結合型グルコース脱水素酵素と実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩について、該タンパク質をコードするアミノ酸配列あるいは当該配列に 1 またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、置換もしくは付加による変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的に活性で安定なタンパク質および塩であり、該理化学的性質をコードするアミノ酸配列に関する。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素であるタンパク質およびその塩は、上記理化学的性質を有する微生物由来が好ましい。本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の由来となる微生物、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有する微生物としては、例えば、原核生物に属するアーカンギウム (Archangium) 属、アーケオグロバス (Archaeoglobus) 属、アーセノフォナス (Arsenophonus) 属、アーレンシア (Ahrensia) 属、アウレオバクテリウム (Aureobacterium) 属、アエロコッカス (Aerococcus) 属、アエロピルム (Aeropyrum) 属、アエロミクロビウム (Aeromicrobium) 属、アエロモナス (Aeromonas) 属、アキフエクス (Aquifex) 属、アクアスピリラム (Aquaspirillum) 属、アクアバクター (Aquabacter) 属、アクアバクテリウム (Aquabacterium) 属、アクアミクロビウム (Aquamicrobium) 属、アクチノアロテイクス (Actinoalloteichus) 属、アクチノキネオスポラ (Actinokineospora) 属、アクチノコラリア (Actinocorallia) 属、アクチノシネマ (Actinosynnema) 属、アクチノスポランギウム (Actinosporangium) 属、アクチノバクルム (Actinobaculum) 属、アクチノバチルス (Actinobacillus) 属、アクチノピクニジウム (Actinopycnidium) 属、アクチノビスポラ (Actinobispora) 属、アクチノプラネス (Actinoplanes) 属、アクチノポリスポラ (Actinopolyspora) 属、アクチノポリモルファ (Actinopolymorpha) 属、アクチノマイセス (Actinomyces) 属、ア

- クチノマジュラ (*Actinomadura*) 属、アクロカルポスポラ (*Acrocarpospora*) 属、アグロコッカス (*Agrococcus*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アグロマイセス (*Agromyces*) 属、アクロマチウム (*Achromatium*) 属、アグロモナス (*Agromonas*) 属、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、アコレプラズマ (*Acholeplasma*) 属、アサイア (*Asaia*) 属、アシジアヌス (*Acidianus*) 属、アシジスファエラ (*Acidisphaera*) 属、アシジフィリウム (*Acidiphilium*) 属、アシジミクロビウム (*Acidimicrobium*) 属、アシジロバス (*Acidilobus*) 属、アシダミノコッカス (*Acidaminococcus*) 属、アシダミノバクター (*Acidaminobacter*) 属、アシチチオバチルス (*Acidithiobacillus*) 属、アジトコッカス (*Agitococcus*) 属、アシドサーマス (*Acidothermus*) 属、アシドセラ (*Acidocella*) 属、アシドバクテリウム (*Acidobacterium*) 属、アシドボラクス (*Acidovorax*) 属、アシドモナス (*Acidomonas*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、アスチカコーリス (*Asticcacaulis*) 属、アステロレプラズマ (*Asteroleplasma*) 属、アセチトマクラム (*Acetitomaculum*) 属、アセチビブリオ (*Acetivibrio*) 属、アセトアナエロビウム (*Acetoanaerobium*) 属、アセトゲニウム (*Acetogenium*) 属、アセトサーマス (*Acetothermus*) 属、アセトネマ (*Acetonema*) 属、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アセトバクテリウム (*Acetobacterium*) 属、アセトハロビウム (*Acetohalobium*) 属、アセトフィラメントム (*Acetofilamentum*) 属、アセトミクロビウム (*Acetomicrobium*) 属、アゾアーカス (*Azoarcus*) 属、アゾスピラ (*Azospira*) 属、アゾスピリラム (*Azospirillum*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、アゾネクサス (*Azonexus*) 属、アゾビブリオ (*Azovibrio*) 属、アゾモナス (*Azomonas*) 属、アゾモノトリコン (*Azomonotrichon*) 属、アゾリゾビウム (*Azorhizobium*) 属、アゾリゾフィラス (*Azorhizophilus*) 属、アトポバクター (*Atopobacter*) 属、アトポビウム (*Atopobium*) 属、アナプラズマ (*Anaplasma*) 属、アニューリニバチルス (*Aneurinibacillus*) 属、アネロアルカス (*Anaeroarcus*) 属、アネロコッカス (*Anaerococcus*) 属、アネロシナス (*Anaerosinus*) 属、アネロバクター (*Anaerobacter*) 属、アネロバクルム (*Anaerobaculum*) 属、アネロビオスピリラム (*Anaerobiospirillum*) 属、アネロビブリオ (*Anaerovibrio*) 属、アネロフィルム (*Anaerofilum*) 属、アネロプラズマ (*Anaeroplasm*) 属、アネロブランカ (*Anaerobranca*) 属、アネロボラクス (*Anaerovorax*) 属、アネロムサ (*Anaeromusa*) 属、アネロラブダス (*Anaerorhabdus*) 属、アノキシバチルス (*Anoxybacillus*) 属、アビオ

- トロフィア (Abiotrophia) 属、アフィピア (Afipia) 属、アマリコッカス (Amaricoccus) 属、アミコラタ (Amycolata) 属、アミコラトプシス (Amycolatopsis) 属、アミノバクター (Aminobacter) 属、アミノバクテリウム (Aminobacterium) 属、アミノモナス (Aminomonas) 属、アメボバクター (Amoebobacter) 属、アモニフィラス (Ammoniphilus) 属、アモニフェクス (Ammonifex) 属、アモルフォスポランギウム (Amorphosporangium) 属、アラクニア (Arachnia) 属、アリシエラ (Alysiella) 属、アリシクロバチルス (Alicyclobacillus) 属、アリシュワネラ (Alishewanella) 属、アルカニボラクス (Alcanivorax) 属、アルカノバクテリウム (Arcanobacterium) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、アルカリバクテリウム (Alkalibacterium) 属、アルカリフィラス (Alkaliphilus) 属、アルコバクター (Arcobacter) 属、アルスロバクター (Arthrobacter) 属、アルテロコッカス (Alterococcus) 属、アルテロモナス (Alteromonas) 属、アルビバクター (Albibacter) 属、アロイオコッカス (Alloiococcus) 属、アロクロマティウム (Allochromatium) 属、アロドモナス (Arhodomonas) 属、アロモナス (Allomonas) 属、アロリゾビウム (Allorhizobium) 属、アンカロクロリス (Ancalochloris) 属、アンカロミクロビウム (Ancalomicrobium) 属、アンギオコッカス (Angiococcus) 属、アングロミクロビウム (Angulomicrobium) 属、アンシロバクター (Ancylobacter) 属、アンタクトバクター (Antarctobacter) 属、アンフィバチルス (Amphibacillus) 属、アンプラリエラ (Ampullariella) 属、イグナビグラナム (Ignavigranum) 属、イジオマリナ (Idiomarina) 属、イソクロマチウム (Isochromatium) 属、イソスフェエラ (Isosphaera) 属、イデオネラ (Ideonella) 属、イリオバクター (Ilyobacter) 属、イントラスポランギウム (Intrasporangium) 属、ウィークセラ (Weeksella) 属、ウィグルスワーシア (Wigglesworthia) 属、ウィリアムシア (Williamsia) 属、ウォリネラ (Wolinella) 属、ウォルバキア (Wolbachia) 属、ウレアプラズマ (Ureaplasma) 属、ウレイバチルス (Ureibacillus) 属、エイケネラ (Eikenella) 属、エーリキア (Ehrlichia) 属、エクシグオバクテリウム (Exiguobacterium) 属、エクセロスポラ (Excellospora) 属、エクトチオロドスピラ (Ectothiorhodospira) 属、エジプシアネラ (Aegyptianella) 属、エッガーセラ (Eggerthella) 属、エッシェリヒア (Escherichia) 属、エドワードシエラ (Edwardsiella) 属、エビングセラ (Ewingella) 属、エペリスロゾーン (Eperythrozoon) 属、エリシペロスリクス (Erysipelothrix) 属、エリスロバクター (Erythrobacter)

- 属、エリスロミクロビウム (*Erythromicrobium*) 属、エリスロモナス (*Erythromonas*) 属、エリトロスポランギウム (*Elytrosporangium*) 属、エルシニア (*Yersinia*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、エレモコッカス (*Eremococcus*) 属、エンシファー (*Ensifer*) 属、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エ
- 5   ントモプラズマ (*Entomoplasma*) 属、エンヒドロバクター (*Enhydrobacter*) 属、エンペドバクター (*Empedobacter*) 属、オエノコッカス (*Oenococcus*) 属、オエルスコビア (*Oerskovia*) 属、オーシャニモナス (*Oceanimonas*) 属、オーシャノスピリラム (*Oceanospirillum*) 属、オキサロバクター (*Oxalobacter*) 属、オキサロファガス (*Oxalophagus*) 属、オキソバクター (*Oxobacter*) 属、オクタデカバクター
- 10   (*Octadecabacter*) 属、オクロバクトラム (*Ochrobactrum*) 属、オシロクロリス (*Oscillochloris*) 属、オシロスピラ (*Oscillospira*) 属、オベスムバクテリウム (*Obesumbacterium*) 属、オリエンチア (*Orientia*) 属、オリゲラ (*Oligella*) 属、オリゴトロファ (*Oligotropha*) 属、オリバクトラム (*Oribaculum*) 属、オルニチニコッカス (*Ornithinococcus*) 属、オルニチニミクロビウム (*Ornithinimicrobium*) 属、オルニ
- 15   トバクテリウム (*Ornithobacterium*) 属、オレニア (*Orenia*) 属、ガードネレラ (*Gardnerella*) 属、カーニモナス (*Carnimonas*) 属、カーノバクテリウム (*Carnobacterium*) 属、カウチオプラネス (*Couchioplanes*) 属、カウドリア (*Cowdria*) 属、カウロバクター (*Caulobacter*) 属、カセオバクター (*Caseobacter*) 属、カテニバクテリウム (*Catenibacterium*) 属、カテニューロプラネス (*Catenuloplanes*) 属、カテ
- 20   ノコッカス (*Catenococcus*) 属、カテラトスポラ (*Catellatospora*) 属、カトネラ (*Catonella*) 属、カプスラリス (*Capsularis*) 属、カプノシトファーガ (*Capnocytophaga*) 属、ガリオネラ (*Gallionella*) 属、カリオファノン (*Caryophanon*) 属、ガリコラ (*Gallicola*) 属、カリマトバクテリウム (*Calymmatobacterium*) 属、カルディオバクテリウム (*Cardiobacterium*) 属、カルディセルロシラプター
- 25   (*Caldicellulosiruptor*) 属、カルディバーガ (*Caldivirga*) 属、カルデロバクテリウム (*Calderobacterium*) 属、カルボキシジブラキウム (*Carboxydibrachium*) 属、カルボキシドサーマス (*Carboxydotherrmus*) 属、カルボフィラス (*Carbophilus*) 属、カロラマター (*Caloramator*) 属、キサントバクター (*Xanthobacter*) 属、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属、キシレラ (*Xylella*) 属、キシロフィラス (*Xylophilus*) 属、キセノ
- 30   ラブダス (*Xenorhabdus*) 属、キタサトア (*Kitasatoa*) 属、キタサトスポラ

- (Kitasatospora) 属、キチノファーガ (Chitinophaga) 属、キトコッカス (Kytococcus) 属、キネオコッカス (Kineococcus) 属、キネオスポリア (Kineosporia) 属、キネラ (Quinella) 属、キブデロスポランギウム (Kibdelosporangium) 属、キャンピロバクター (Campylobacter) 属、キングセラ (Kingella) 属、クツネリア (Kutzneria) 属、クプリアビダス (Cupriavidus) 属、クラウロコッカス (Craurococcus) 属、グラシエコラ (Glacielecola) 属、グラシリバチルス (Gracilibacillus) 属、グラニューリカテラ (Granulicatella) 属、グラハメラ (Grahamella) 属、クラビバクター (Clavibacter) 属、クラミジア (Chlamydia) 属、クラミドフィラ (Chlamydophila) 属、クリオバクテリウム (Cryobacterium) 属、グリコマイセス (Glycomyces) 属、クリシオゲネス (Chrysiogenes) 属、クリスチスピラ (Cristispira) 属、クリセオバクテリウム (Chryseobacterium) 属、クリセオモナス (Chryseomonas) 属、クリナリウム (Crinalium) 属、クリプトスポランギウム (Cryptosporangium) 属、クリプトバクテリウム (Cryptobacterium) 属、クリベラ (Kluyvera) 属、クリベラ (Kribbella) 属、グルコナセトバクター (Gluconacetobacter) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属、クルチア (Kurthia) 属、クルトバクテリウム (Curtobacterium) 属、クレノスリクス (Crenothrix) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、クレベランジナ (Clevelandina) 属、クロシエレラ (Crossiella) 属、クロストリジウム (Clostridium) 属、グロビカテラ (Globicatella) 属、クロマティウム (Chromatium) 属、クロモバクテリウム (Chromobacterium) 属、クロモハロバクター (Chromohalobacter) 属、クロロネマ (Chloronema) 属、クロロビウム (Chlorobium) 属、クロロフレクサス (Chloroflexus) 属、クロロヘルペトン (Chloroherpeton) 属、ケディバクター (Caedibacter) 属、ケトグロニシゲニウム (Ketogulonicigenium) 属、ゲマータ (Gemmata) 属、ゲミガー (Gemmiger) 属、ゲメラ (Gemella) 属、ゲモバクター (Gemmobacter) 属、ケラトコッカス (Chelatococcus) 属、ケラトバクター (Chelatobacter) 属、ゲリジバクター (Gelidibacter) 属、コエノニア (Coenonia) 属、コクシエレラ (Coxiella) 属、コクリア (Kocuria) 属、コセラ (Koserella) 属、コプロコッカス (Coproccoccus) 属、コプロサーモバクター (Coprothermobacter) 属、コプロバチルス (Coprobaillus) 属、コマモナス (Comamonas) 属、コリオバクテリウム (Coriobacterium) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、コリンセラ (Collinsella) 属、コルウェリア

(Colwellia) 属、ゴルドニア (Gordonia) 属、コングロメロモナス (Conglomeromonas) 属、コンドロマイセス (Chondromyces) 属、サーマエロバクター (Thermaerobacter) 属、サーマス (Thermus) 属、サーマセトゲニウム (Thermacetogenium) 属、サーマネロビブリオ (Thermanaerovibrio) 属、サーミカヌス (Thermicanus) 属、サーミチオバチルス (Thermithiobacillus) 属、サーモアクチノマイセス (Thermoactinomyces) 属、  
5 サーマアナエロバクター (Thermoanaerobacter) 属、サーモアナエロバクテリウム (Thermoanaerobacterium) 属、サーモアナエロビウム (Thermoanaerobium) 属、サーモクラヂウム (Thermocladium) 属、サーモクリスパム (Thermocrispum) 属、サーモクリニス (Thermocrinis) 属、サーモクロマチウム (Thermochromatium) 属、サーモコッカス (Thermococcus) 属、サーモシフォ (Thermosipho) 属、サーモシントロファ (Thermosyntropha) 属、サーモスフェラ (Thermosphaera) 属、サーモスリクス (Thermothrix) 属、サーモデスルフォバクテリウム (Thermodesulfobacterium) 属、  
10 サーマデスルフォビブリオ (Thermodesulfovibrio) 属、サーモデスルフォラブダス (Thermodesulforhabdus) 属、サーモテラバクテリウム (Thermoterrabacterium) 属、  
15 サーマトガ (Thermotoga) 属、サーモネマ (Thermonema) 属、サーモハイドロゲニウム (Thermohydrogenium) 属、サーモバクテロイデス (Thermobacteroides) 属、サーモバチルス (Thermobacillus) 属、サーモハロバクター (Thermohalobacter) 属、サーモビスポラ (Thermobispora) 属、サーモビフィダ (Thermobifida) 属、サーモフィルム (Thermofilum) 属、サーモブラキウム (Thermobrachium) 属、サーモプラズマ (Thermoplasma) 属、サーモプロテウス (Thermoproteus) 属、サーモミクロビウム (Thermomicrobium) 属、サーモモノスポラ (Thermomonospora) 属、サーモレオフィラム (Thermoleophilum) 属、サイトファーガ (Cytophaga) 属、ザイモバクター (Zymobacter) 属、ザイモフィラス (Zymophilus) 属、ザイモモナス (Zymomonas) 属、サギツラ (Sagittula) 属、サッカロコッカス (Saccharococcus) 属、サッカロスリクス (Saccharothrix) 属、サッカロバクター (Saccharobacter) 属、サッカロポリスポラ (Saccharopolyspora) 属、サッカロモノスポラ (Saccharomonospora) 属、ザバルジニア (Zavarzinia) 属、サブテルコラ (Subtercola) 属、サプロスピラ (Saprospira) 属、サムソニア (Samsonia) 属、サリニコッカス (Salinicoccus) 属、サリニビブリオ (Salinivibrio) 属、サリバチルス (Salibacillus) 属、サルコビウム (Sarcobium) 属、  
20 サルチナ (Sarcina) 属、サルモネラ (Salmonella) 属、サレゲンチバクター

(Salegentibacter) 属、サングイバクター (Sanguibacter) 属、サンダラシノバクター (Sandaracinobacter) 属、ジアドバクター (Dyadobacter) 属、ジアリスター (Dialister) 属、ジエッチア (Dietzia) 属、シェワネラ (Shewanella) 属、ジオスリクス (Geothrix) 属、ジオダーマトフィラス (Geodermatophilus) 属、ジオトガ (Geotoga) 属、ジオバクター (Geobacter) 属、ジオバチルス (Geobacillus) 属、ジオ  
5 ビブリオ (Geovibrio) 属、ジクチオグロムス (Dictyoglomus) 属、シクロクラスチカス (Cycloclasticus) 属、シクロセルペンス (Psychroserpens) 属、シクロバクター (Psychrobacter) 属、シクロバクテリウム (Cyclobacterium) 属、シクロフレキサス (Psychroflexus) 属、シクロモナス (Psychromonas) 属、シゲラ (Shigella) 属、ジケ  
10 ロバクター (Dichelobacter) 属、ジコトミクロビウム (Dichotomicrobium) 属、ジス  
ゴノモナス (Dysgonomonas) 属、シストバクター (Cystobacter) 属、シトロバクター (Citrobacter) 属、シナギステス (Synergistes) 属、シノリゾビウム (Sinorhizobium) 属、ジプロカリクス (Diplocalyx) 属、シムカニア (Simkania) 属、  
シモンシエラ (Simonsiella) 属、ジャニバクター (Janibacter) 属、ジャンチノバク  
15 テリウム (Janthinobacterium) 属、シューダミノバクター (Pseudaminobacter) 属、  
シュードアミコラタ (Pseudoamycolata) 属、シュードアルテロモナス (Pseudoalteromonas) 属、シュードキサントモナス (Pseudoxanthomonas) 属、シュード  
ドケジバクター (Pseudocaedibacter) 属、シュードノカルジア (Pseudonocardia) 属、  
シュードブチリビブリオ (Pseudobutyrvibrio) 属、シュードモナス (Pseudomonas)  
20 属、シュードラミバクター (Pseudoramibacter) 属、シュバルチア (Schwartzia) 属、  
ジョネシア (Jonesia) 属、ジョンソネラ (Johnsonella) 属、シリシバクター (Silicibacter) 属、シントロファス (Syntrophus) 属、シントロフォコッカス (Syntrophococcus) 属、シントロフォサーマス (Syntrophothermus) 属、シントロフ  
25 オスポラ (Syntrophospora) 属、シントロフォバクター (Syntrophobacter) 属、シン  
トロフォボツルス (Syntrophobotulus) 属、シントロフォモナス (Syntrophomonas) 属、  
シンビオテス (Symbiotes) 属、シンビオバクテリウム (Symbiobacterium) 属、ズーグ  
ロエア (Zoogloea) 属、ズガネラ (Duganella) 属、スキネリア (Schineria) 属、スクシ  
ニクラスチカム (Succiniclasticum) 属、スクシニスピラ (Succinispira) 属、スクシ  
ニビブリオ (Succinivibrio) 属、スクシニモナス (Succinimonas) 属、スケルマニア  
30 (Skermania) 属、スケルマネラ (Skermanella) 属、スターケヤ (Starkeya) 属、スタッ

ピア (Stappia) 属、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 属、スタフィロサーマス (Staphylothermus) 属、スタレヤ (Staleyia) 属、スチギオロバス (Stygiolobus) 属、スチビオバクター (Stibiobacter) 属、スティグマテラ (Stigmatella) 属、ステテリア (Stetteria) 属、ステノトロフォモナス (Stenotrophomonas) 属、ステラ (Stella) 属、ステレラ (Sutterella) 属、ストネラ (Suttonella) 属、ストマトコッカス (Stomatococcus) 属、ストレプトアロテイクス (Streptoalloteichus) 属、ストレプトコッカス (Streptococcus) 属、ストレプトスポランギウム (Streptosporangium) 属、ストレプトバーチシリウム (Streptoverticillium) 属、ストレプトバチルス (Streptobacillus) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、ストレプトモノスポラ (Streptomonospora) 属、スピリラム (Spirillum) 属、スピリリプラネス (Spirilliplanes) 属、スピリロスポラ (Spirillospora) 属、スピロソーマ (Spirosoma) 属、スピロプラズマ (Spiroplasma) 属、スピロヘータ (Spirochaeta) 属、スフィンゴバクテリウム (Sphingobacterium) 属、スフィンゴビウム (Sphingobium) 属、スフィンゴピクシス (Sphingopyxis) 属、スフェロチラス (Sphaerotilus) 属、スフェロバクター (Sphaerobacter) 属、スフェンゴモナス (Sphingomonas) 属、スポリクチャ (Sporichthya) 属、スポロサイトファーガ (Sporocytophaga) 属、スポロサルチナ (Sporosarcina) 属、スポロトマクルム (Sporotomaculum) 属、スポロバクター (Sporobacter) 属、スポロバクテリウム (Sporobacterium) 属、スポロハロバクター (Sporohalobacter) 属、スポロムサ (Sporomusa) 属、スポロラクトバチルス (Sporolactobacillus) 属、スミセラ (Smithella) 属、スラッキア (Slackia) 属、スルフイトバクター (Sulfitobacter) 属、スルフォバチルス (Sulfobacillus) 属、スルフォボコッカス (Sulfophobococcus) 属、スルフォロバス (Sulfolobus) 属、スルフルスフェラ (Sulfurisphaera) 属、スルフロコッカス (Sulfurococcus) 属、スルフロスピリラム (Sulfurospirillum) 属、セデセア (Cedecea) 属、セトバクテリウム (Cetobacterium) 属、セバルデラ (Sebaldella) 属、セラチア (Serratia) 属、セリベリア (Seliberia) 属、セルビブリオ (Cellvibrio) 属、セルプラ (Serpula) 属、セルプリーナ (Serpulina) 属、セルペンス (Serpens) 属、セルロシマイクロビウム (Cellulosimicrobium) 属、セルロファーガ (Cellulophaga) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、セレンニハラネロバクター (Selenihalanaerobacter) 属、セレンオモナス (Selenomonas) 属、センチピーダ (Centipeda) 属、ソダリス (Sodalis) 属、ソ

ベリア (*Zobellia*) 属、ソロバクテリウム (*Solobacterium*) 属、タウエラ (*Thauera*) 属、  
ダクチロスポランギウム (*Dactylosporangium*) 属、タツメラ (*Tatumella*) 属、タトロ  
キア (*Tatlockia*) 属、タラソモナス (*Thalassomonas*) 属、チアルカリコッカス  
(*Thi alkalicooccus*) 属、チアルカリビブリオ (*Thi alkalivibrio*) 属、チアルカリミク  
5 ロビウム (*Thi alkalimicrobium*) 属、チオカプサ (*Thiocapsa*) 属、チオコッカス  
(*Thiococcus*) 属、チオジクチオン (*Thiodictyon*) 属、チオシステイス (*Thiocystis*)  
属、チオスピラ (*Thiospira*) 属、チオスピリラム (*Thiospirillum*) 属、チオスフェラ  
(*Thiosphaera*) 属、チオスリクス (*Thiothrix*) 属、チオバクテリウム  
(*Thiobacterium*) 属、チオバチルス (*Thiobacillus*) 属、チオハロカプサ  
10 (*Thiohalocapsa*) 属、チオフラビコッカス (*Thioflavicooccus*) 属、チオブラム  
(*Thiovulum*) 属、チオプロカ (*Thioploca*) 属、チオペジア (*Thiopedia*) 属、チオマル  
ガリータ (*Thiomargarita*) 属、チオミクロスピラ (*Thiomicrospira*) 属、チオモナス  
(*Thiomonas*) 属、チオランプロブム (*Thiolamprobum*) 属、チオロドコッカス  
(*Thiorhodococcus*) 属、チオロドスピラ (*Thiorhodospira*) 属、チオロドビブリオ  
15 (*Thiorhodovibrio*) 属、チシエレラ (*Tissierella*) 属、チャイニア (*Chainia*) 属、チ  
ンダリア (*Tindallia*) 属、ツカムレラ (*Tsukamurella*) 属、ツリセラ (*Turicella*) 属、  
デイノコッカス (*Deinococcus*) 属、デイノバクター (*Deinobacter*) 属、テイロレラ  
(*Taylorella*) 属、テクチバクター (*Tectibacter*) 属、デクロロソーマ  
(*Dechlorosoma*) 属、デクロロモナス (*Dechloromonas*) 属、テサラコッカス  
20 (*Tessaracoccus*) 属、デスルファシナム (*Desulfacinum*) 属、デスルフイタバクテリ  
ウム (*Desulfitobacterium*) 属、デスルフォカプサ (*Desulfocapsa*) 属、デスルフォコ  
ッカス (*Desulfococcus*) 属、デスルフォサルチナ (*Desulfosarcina*) 属、デスルフォ  
スピラ (*Desulfospira*) 属、デスルフォスポロシナス (*Desulfosporosinus*) 属、デス  
ルフォセラ (*Desulfocella*) 属、デスルフォタレア (*Desulfotalea*) 属、デスルフォチ  
25 グナム (*Desulfotignum*) 属、デスルフォトマクラム (*Desulfotomaculum*) 属、デスル  
フォナトロナム (*Desulfonatronum*) 属、デスルフォナトロノビブリオ  
(*Desulfonatronovibrio*) 属、デスルフォニスポラ (*Desulfonispora*) 属、デスルフォ  
ネマ (*Desulfonema*) 属、デスルフォバーガ (*Desulfovirga*) 属、デスルフォバクター  
(*Desulfobacter*) 属、デスルフォバクテリウム (*Desulfobacterium*) 属、デスルフォ  
30 バクラ (*Desulfobacula*) 属、デスルフォバック (*Desulfobacca*) 属、デスルフォバル

- バス (Desulfobulbus) 属、デスルフォハロビウム (Desulfohalobium) 属、デスルフォ  
ビブリオ (Desulfovibrio) 属、デスルフォファスティス (Desulfofustis) 属、デスル  
フォファバ (Desulfofaba) 属、デスルフォフリガス (Desulfofrigus) 属、デスルフォ  
ミクロビウム (Desulfomicrobium) 属、デスルフォモナス (Desulfomonas) 属、デスル  
5 フォモニレ (Desulfomonile) 属、デスルフォラブダス (Desulforhabdus) 属、デスル  
フォロパルス (Desulforhopalus) 属、デスルフレラ (Desulfurella) 属、デスルフロ  
コッカス (Desulfurococcus) 属、デスルフロバクテリウム (Desulfurobacterium) 属、  
デスルフロムサ (Desulfuromusa) 属、デスルフロモナス (Desulfuromonas) 属、デス  
ルフロロパス (Desulfurolobus) 属、デセンジア (Desemzia) 属、デチオスルフォビブ  
10 リオ (Dethiosulfovibrio) 属、テトラゲノコッカス (Tetragenococcus) 属、テトラス  
フェラ (Tetrasphaera) 属、デニトロバクテリウム (Denitrobacterium) 属、デニトロ  
ビブリオ (Denitrovibrio) 属、デハロバクター (Dehalobacter) 属、テピチモナス  
(Tepidimonas) 属、デフェリバクター (Deferribacter) 属、デフラビバクター  
(Defluviobacter) 属、デボシア (Devosia) 属、デメトリア (Demetria) 属、テラコッカ  
15 ス (Terracoccus) 属、テラバクター (Terrabacter) 属、デルクシア (Derxia) 属、デル  
フチア (Delftia) 属、デルマコッカス (Dermacoccus) 属、デルマトフィラス  
(Dermatophilus) 属、デルマバクター (Dermabacter) 属、テルリア (Telluria) 属、デ  
レヤ (Deleya) 属、デンドロスポロバクター (Dendrosporobacter) 属、トキソスリク  
20 ス (Toxothrix) 属、トラブルシエラ (Trabulsiella) 属、トリクロロバクター  
(Trichlorobacter) 属、トリココッカス (Trichococcus) 属、トルモナス (Tolumonas)  
属、トレポネマ (Treponema) 属、ドロシグラヌラム (Dolosigranulum) 属、ドロシコ  
ッカス (Dolosicoccus) 属、トロフェリマ (Tropheryma) 属、ナイセリア (Neisseria)  
属、ナトリアルバ (Natrialba) 属、ナトリネマ (Natrinema) 属、ナトロニエレラ  
(Natroniella) 属、ナトロニンコラ (Natronincola) 属、ナトロノコッカス  
25 (Natronococcus) 属、ナトロノバクテリウム (Natronobacterium) 属、ナトロノモナ  
ス (Natronomonas) 属、ナトロノルブルム (Natronorubrum) 属、ナノシスティス  
(Nannocystis) 属、ニトロコッカス (Nitrococcus) 属、ニトロスピナ (Nitrospina) 属、  
ニトロスピラ (Nitrospira) 属、ニトロソコッカス (Nitrosococcus) 属、ニトロソス  
ピラ (Nitrosospira) 属、ニトロソモナス (Nitrosomonas) 属、ニトロソロパス  
30 (Nitrosolobus) 属、ニトロバクター (Nitrobacter) 属、ネオクラミジア

- (Neochlamydia) 属、ネオリケッチア (Neorickettsia) 属、ネステレンコニア (Nesterenkonia) 属、ネブスキア (Nevskia) 属、ネプツノモナス (Neptunomonas) 属、ノカルジア (Nocardia) 属、ノカルジオイデス (Nocardioides) 属、ノカルジオプシス (Nocardiopsis) 属、ノノムラエア (Nonomuraea) 属、ノボスフィンゴビウム (Novosphingobium) 属、パージバチルス (Virgibacillus) 属、ハイドロゲノバクター (Hydrogenobacter) 属、ハイドロゲノビブリオ (Hydrogenovibrio) 属、ハイドロゲノファーガ (Hydrogenophaga) 属、ハイドロゲノフィラス (Hydrogenophilus) 属、ハイパーサーマス (Hyperthermus) 属、ハイフォミクロビウム (Hyphomicrobium) 属、ハイフォモナス (Hyphomonas) 属、パウシモナス (Paucimonas) 属、バクテリオネマ (Bacterionema) 属、バクテリオボラクス (Bacteriovorax) 属、バクテロイデス (Bacteroides) 属、バクトデルマ (Bactoderma) 属、バゴコッカス (Vagococcus) 属、パストリア (Pasteuria) 属、パストレラ (Pasteurella) 属、バチルス (Bacillus) 属、パピリバクター (Papillibacter) 属、ハフニア (Hafnia) 属、ハヘラ (Hahella) 属、パラクラウロコッカス (Paracraurococcus) 属、パラクラミジア (Parachlamydia) 属、パラコッカス (Paracoccus) 属、ハラネロバクター (Halanaerobacter) 属、ハラネロビウム (Halanaerobium) 属、パララクトバチルス (Paralactobacillus) 属、バリオボラクス (Variovorax) 属、ハリスコメノバクター (Haliscomenobacter) 属、バルトネラ (Bartonella) 属、バルネアトリクス (Balneatrix) 属、パレオコッカス (Palaeococcus) 属、ハレラ (Hallella) 属、ハロアルキュラ (Haloarcula) 属、ハロインコラ (Haloincola) 属、ハロクロマチウム (Halochromatium) 属、ハロコッカス (Halococcus) 属、ハロサーモスリクス (Halothermothrix) 属、ハロジオメトリカム (Halogeometricum) 属、ハロスピルリナ (Halospirulina) 属、ハロセラ (Halocella) 属、ハロチオバチルス (Halothiobacillus) 属、ハロテリゲナ (Haloterrigena) 属、ハロナトロナム (Halonatronum) 属、ハロバキュラム (Halobaculum) 属、ハロバクテリアウム (Halobacterium) 属、ハロバクテロイデス (Halobacteroides) 属、ハロバチルス (Halobacillus) 属、ハロビブリオ (Halovibrio) 属、ハロフェラクス (Haloferax) 属、ハロメタノコッカス (Halomethanococcus) 属、ハロモナス (Halomonas) 属、ハロラブダス (Halorhabdus) 属、ハロルブルム (Halorubrum) 属、ハロルubroバクテリアウム (Halorubrobacterium) 属、ハロロドスピラ (Halorhodospira) 属、パントエア (Pantoea) 属、パンドラエア (Pandoraea) 属、パンピロビブリオ (Vampirovibrio) 属、

ピクロフィラス (Picrophilus) 属、ピシリケッチア (Piscirickettsia) 属、ヒッペア (Hippea) 属、ビトレオシラ (Vitreoscilla) 属、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属、ビブリオ (Vibrio) 属、ヒメノバクター (Hymenobacter) 属、  
5 ピメロバクター (Pimelobacter) 属、ピリメリア (Pilimelia) 属、ヒルスキア (Hirschia) 属、ピレラ (Pirella) 属、ピレルラ (Pirellula) 属、ピロコッカス (Pyrococcus) 属、ピロジクチウム (Pyrodictium) 属、ピロチナ (Pillotina) 属、ピロバクルム (Pyrobaculum) 属、ピロフィラ (Bilophila) 属、ピロロパス (Pyrolobus) 属、  
ファエニア (Faenia) 属、ファクラミア (Facklamia) 属、ファスコラクトバクテリウム (Phascolarctobacterium) 属、ファルシビブリオ (Falcivibrio) 属、ファンジバ  
10 クター (Fundibacter) 属、フィネゴルジア (Finegoldia) 属、フィプロバクター (Fibrobacter) 属、フィリバクター (Filibacter) 属、フィリファクター (Filifactor) 属、フィロバクテリウム (Phyllobacterium) 属、フィロバチルス (Filobacillus) 属、フィロミクロビウム (Filomicrobium) 属、フェオスピリラム (Phaeospirillum) 属、フェニロバクテリウム (Phenylobacterium) 属、フェリバクテ  
15 リウム (Ferribacterium) 属、フェリモナス (Ferrimonas) 属、フェルビドバクテリウム (Fervidobacterium) 属、フェログロパス (Ferroglobus) 属、フェロプラズマ (Ferroplasma) 属、フォコエノバクター (Phocoenobacter) 属、フォトバクテリウム (Photobacterium) 属、フォトラブダス (Photorhabdus) 属、フォルミビブリオ (Formivibrio) 属、フソバクテリウム (Fusobacterium) 属、ブチアウクセラ  
20 (Buttiauxella) 属、ブチリビブリオ (Butyrivibrio) 属、ブデロビブリオ (Bdellovibrio) 属、ブドビシア (Budvicia) 属、プフェニジア (Pfennigia) 属、ブフネラ (Buchnera) 属、フュージバクター (Fusibacter) 属、プラウセレラ (Prauserella) 属、プラギア (Pragia) 属、ブラキスピラ (Brachyspira) 属、ブラキバクテリウム (Brachybacterium) 属、ブラキモナス (Brachymonas) 属、ブラストクロリス (Blastochloris) 属、ブラストコッカス (Blastococcus) 属、ブラストバクター (Blastobacter) 属、ブラストモナス (Blastomonas) 属、ブラタバクテリウム (Blattabacterium) 属、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属、フラテウリア (Frateuria) 属、ブラナメラ (Branhamella) 属、プラノコッカス (Planococcus) 属、  
25 プラノテトラスポラ (Planotetraspora) 属、プラノビスポラ (Planobispora) 属、プ  
30 ラノポリスポラ (Planopolyspora) 属、プラノミクロビウム (Planomicrobium) 属、プ

ラノモノスポラ (Planomonospora) 属、フラビモナス (Flavimonas) 属、フラボバクテ  
リウム (Flavobacterium) 属、フラメオバーガ (Flammeovirga) 属、フランキア  
(Frankia) 属、プランクトマイセス (Planctomyces) 属、フランシセラ (Francisella)  
属、フリードマニエラ (Friedmanniella) 属、フリゴリバクテリウム  
5 (Frigoribacterium) 属、フルオリバクター (Fluoribacter) 属、ブルクホルデリア  
(Burkholderia) 属、ブルセラ (Brucella) 属、ブレイジア (Bulleidia) 属、フレキシ  
スチペス (Flexistipes) 属、フレキシスリクス (Flexithrix) 属、フレキシバクター  
(Flexibacter) 属、フレクトバチルス (Flectobacillus) 属、プレシオモナス  
(Plesiomonas) 属、ブレネリア (Brenneria) 属、ブレパンジモナス (Brevundimonas)  
10 属、ブレビネマ (Brevinema) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、ブレビ  
バチルス (Brevibacillus) 属、プレボテラ (Prevotella) 属、プロクロコッカス  
(Prochlorococcus) 属、プロクロロスリクス (Prochlorothrix) 属、プロクロロン  
(Prochloron) 属、プロコトリクス (Brochothrix) 属、プロステコクロリス  
(Prosthecochloris) 属、プロステコバクター (Prosthecobacter) 属、プロステコミ  
15 クロビウム (Prosthecomicrobium) 属、プロテウス (Proteus) 属、プロトモナス  
(Protomonas) 属、プロピオニゲニウム (Propionigenium) 属、プロピオニスピラ  
(Propionispira) 属、プロピオニスボラ (Propionispora) 属、プロピオニバクター  
(Propionibacter) 属、プロピオニバクテリウム (Propionibacterium) 属、プロピオ  
ニビブリオ (Propionivibrio) 属、プロピオニフェラクス (Propioniferax) 属、プロ  
20 ビデンシア (Providencia) 属、プロミクロモノスポラ (Promicromonospora) 属、プロ  
リノボルス (Prolinoborus) 属、ベイジリンキア (Beijerinckia) 属、ベイロネラ  
(Veillonella) 属、ベウテンベルギア (Beutenbergia) 属、ベギアトア (Beggiatoa) 属、  
ペクチナタス (Pectinatus) 属、ペクトバクテリウム (Pectobacterium) 属、ベジオコ  
ッカス (Pediococcus) 属、ペドバクター (Pedobacter) 属、ペドミクロビウム  
25 (Pedomicrobium) 属、ペトロトガ (Petrotoga) 属、ペニバチルス (Paenibacillus) 属、  
ベネッケア (Beneckea) 属、ペプトコッカス (Peptococcus) 属、ペプトストレプトコ  
ッカス (Peptostreptococcus) 属、ペプトニフィラス (Peptoniphilus) 属、ヘモバル  
トネラ (Haemobartonella) 属、ヘモフィルス (Haemophilus) 属、ヘリオスリクス  
(Heliothrix) 属、ヘリオバクテリウム (Heliobacterium) 属、ヘリオバチルス  
30 (Heliobacillus) 属、ヘリオフィラム (Heliophilum) 属、ヘリオレスティス

- (Heliorestis) 属、ヘリコバクター (Helicobacter) 属、ペリステガ (Pelistega) 属、ペルクザリア (Pelczaria) 属、ベルゲイエラ (Bergeyella) 属、ヘルココッカス (Helcococcus) 属、ベルコシスポラ (Verrucosispora) 属、ベルコミクロビウム (Verrucomicrobium) 属、ペルシコバクター (Persicobacter) 属、ヘルバスピリラム (Herbaspirillum) 属、ヘルビドスポラ (Herbidospora) 属、ヘルペトシフォン (Herpetosiphon) 属、ペロジクチオン (Pelodictyon) 属、ペロスポラ (Pelospora) 属、ペロバクター (Pelobacter) 属、ボゲセラ (Vogesella) 属、ボゴリエラ (Bogoriella) 属、ボセア (Bosea) 属、ポラリバクター (Polaribacter) 属、ポラロモナス (Polaromonas) 属、ホランディナ (Hollandina) 属、ポリアンギウム (Polyangium) 属、ポリヌクレオバクター (Polynucleobacter) 属、ボルカニエレラ (Volcaniella) 属、ボルデテラ (Bordetella) 属、ホルデマニア (Holdemania) 属、ポルフィロバクター (Porphyrobacter) 属、ポルフィロモナス (Porphyromonas) 属、ボレリア (Borrelia) 属、ホロスポラ (Holospora) 属、ホロファーガ (Holophaga) 属、ホンギア (Hongia) 属、マイオサーマス (Meiothermus) 属、マイコバクテリウム (Mycobacterium) 属、マイコプラズマ (Mycoplasma) 属、マイコプラナ (Mycoplana) 属、マイセトコラ (Mycetocola) 属、マイロイデス (Myroides) 属、マグネトスピリラム (Magnetospirillum) 属、マクロコッカス (Macrococcus) 属、マクロモナス (Macromonas) 属、マッシリア (Massilia) 属、マリカウリス (Maricaulis) 属、マリクロマチウム (Marichromatium) 属、マリココッカス (Marinococcus) 属、マリニトガ (Marinitoga) 属、マリニラビリア (Marinilabilia) 属、マリノスピリラム (Marinospirillum) 属、マリノバクター (Marinobacter) 属、マリノバクテリウム (Marinobacterium) 属、マリノモナス (Marinomonas) 属、マルモリコラ (Marmoricola) 属、マロノモナス (Malonomonas) 属、マンハイミア (Mannheimia) 属、ミカビブリオ (Micavibrio) 属、ミクソコッカス (Myxococcus) 属、ミクロエロスポリア (Microellobosporia) 属、ミクロコッカス (Micrococcus) 属、ミクロシラス (Microcylus) 属、ミクロシスティス (Microcystis) 属、ミクロシラ (Microscilla) 属、ミクロスフェラ (Microsphaera) 属、ミクロテトラスポラ (Microtetraspora) 属、ミクロバーグラ (Microvirgula) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ミクロバルビファー (Microbulbifer) 属、ミクロビスポラ (Microbispora) 属、ミクロブルイナ (Micropruina) 属、ミクロポリスポラ (Micropolyspora) 属、ミクロモナス

- (Micromonas) 属、ミクロモノスポラ (Micromonospora) 属、ミクロルナタス (Microlunatus) 属、ミツオケラ (Mitsuokella) 属、メガスフェラ (Megasphaera) 属、メガモナス (Megamonas) 属、メソフィロバクター (Mesophilobacter) 属、メソプラズマ (Mesoplasma) 属、メソリゾビウム (Mesorhizobium) 属、メタニミクロコッカス (Methanimicrococcus) 属、メタノカルキュラス (Methanocalculus) 属、メタノクレウス (Methanoculleus) 属、メタノゲニウム (Methanogenium) 属、メタノコーパスクルム (Methanocorpusculum) 属、メタノココイデス (Methanococcoides) 属、メタノコッカス (Methanococcus) 属、メタノサーマス (Methanothermus) 属、メタノサーモバクター (Methanothermobacter) 属、メタノサエタ (Methanosaeta) 属、メタノサルチナ (Methanosarcina) 属、メタノスピリラム (Methanospirillum) 属、メタノスフェラ (Methanosphaera) 属、メタノスリクス (Methanothrix) 属、メタノバクテリウム (Methanobacterium) 属、メタノハロビウム (Methanohalobium) 属、メタノハロフィラス (Methanohalophilus) 属、メタノピラス (Methanopyrus) 属、メタノフォリス (Methanofollis) 属、メタノプランス (Methanoplanus) 属、メタノブレビバクター (Methanobrevibacter) 属、メタノミクロビウム (Methanomicrobium) 属、メタノラシニア (Methanolacinia) 属、メタノロバス (Methanolobus) 属、メタロスフェラ (Metallosphaera) 属、メチルアーキュリア (Methylarcula) 属、メチロカルダム (Methylocaldum) 属、メチロコッカス (Methylococcus) 属、メチロサルチナ (Methylosarcina) 属、メチロシスティス (Methylocystis) 属、メチロシナス (Methylosinus) 属、メチロスフェラ (Methylosphaera) 属、メチロセラ (Methylocella) 属、メチロバクター (Methylobacter) 属、メチロバクテリウム (Methylobacterium) 属、メチロバチルス (Methylobacillus) 属、メチロピラ (Methylopila) 属、メチロファーガ (Methylophaga) 属、メチロフィラス (Methylophilus) 属、メチロボラス (Methylovorus) 属、メチロミクロビウム (Methylomicrobium) 属、メチロモナス (Methylomonas) 属、メチロラブダス (Methylorhabdus) 属、メニスカス (Meniscus) 属、メリタンギウム (Melittangium) 属、メリッソコッカス (Melissococcus) 属、モエレレラ (Moellerella) 属、モーレラ (Moorella) 属、モギバクテリウム (Mogibacterium) 属、モデストバクター (Modestobacter) 属、モビランカス (Mobiluncus) 属、モラキセラ (Moraxella) 属、モルガネラ (Morganella) 属、モルチエレラ (Mortierella) 属、モロコッカス

- (Morococcus) 属、ユーバクテリウム (Eubacterium) 属、ヨードバクター (Iodobacter) 属、ヨケネラ (Yokenella) 属、ラーネラ (Rahnella) 属、ラウールテラ (Raoultella) 属、ラクトコッカス (Lactococcus) 属、ラクトスフェラ (Lactosphaera) 属、ラクトバチルス (Lactobacillus) 属、ラクノスピラ (Lachnospira) 属、ラタイバクター (Rathayibacter) 属、ラブドクロマチウム (Rhabdochromatium) 属、ラブリス (Labrys) 属、ラルストニア (Ralstonia) 属、ラロバクター (Rarobacter) 属、ランプロシスティス (Lamprocystis) 属、ランプロバクター (Lamprobacter) 属、ランプロペディア (Lampropedia) 属、リエメラ (Riemerella) 属、リケッチア (Rickettsia) 属、リケッチエレラ (Rickettsiella) 属、リケネラ (Rikenella) 属、リステリア (Listeria) 属、リストネラ (Listonella) 属、リソバクター (Lysobacter) 属、リゾバクター (Rhizobacter) 属、リゾビウム (Rhizobium) 属、リゾモナス (Rhizomonas) 属、リチカム (Lyticum) 属、リムノバクター (Limnobacter) 属、ルイネラ (Lewinella) 属、ルエゲリア (Ruegeria) 属、ルガモナス (Rugamonas) 属、ルシバクテリウム (Lucibacterium) 属、ルテイモナス (Luteimonas) 属、ルテオコッカス (Luteococcus) 属、ルネラ (Runella) 属、ルブリビバクス (Rubrivivax) 属、ルブリモナス (Rubrimonas) 属、ルプロバクター (Rubrobacter) 属、ルミノコッカス (Ruminococcus) 属、ルミノバクター (Ruminobacter) 属、レイフソニア (Leifsonia) 属、レクレルシア (Leclercia) 属、レケバリエリア (Lechevalieria) 属、レジオネラ (Legionella) 属、レニバクテリウム (Renibacterium) 属、レビネア (Levinea) 属、レプトスピラ (Leptospira) 属、レプトスポリラム (Leptospirillum) 属、レプトスリクス (Leptothrix) 属、レプトトリキア (Leptotrichia) 属、レプトネマ (Leptonema) 属、レミノレラ (Leminorella) 属、レンツェア (Lentzea) 属、ロイコスリクス (Leucothrix) 属、ロイコノストック (Leuconostoc) 属、ロイコバクター (Leucobacter) 属、ローソニア (Lawsonia) 属、オートロピア (Lautropia) 属、ロカリメア (Rochalimaea) 属、ロセアテレス (Roseateles) 属、ロセイナトロノバクター (Roseinatronobacter) 属、ロセイビウム (Roseibium) 属、ロセイビバクス (Roseivivax) 属、ロセオコッカス (Roseococcus) 属、ロセオスピラ (Roseospira) 属、ロセオスピリラム (Roseospirillum) 属、ロセオバクター (Roseobacter) 属、ロセオバリウス (Roseovarius) 属、ロセオモナス (Roseomonas) 属、ロセブリア (Roseburia) 属、ロダノバクター (Rhodanobacter) 属、

ロチア (*Rothia*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、ロドサーマス (*Rhodothermus*) 属、ロドシクルス (*Rhodocyclus*) 属、ロドシスタ (*Rhodocista*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、ロドスピラ (*Rhodospira*) 属、ロドスピリラム (*Rhodospirillum*) 属、ロドタラシウム (*Rhodothalassium*) 属、ロドバカ (*Rhodobaca*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属、ロドビウム (*Rhodobium*) 属、ロドビブリオ (*Rhodovibrio*) 属、ロドピラ (*Rhodopila*) 属、ロドフェラクス (*Rhodoferax*) 属、ロドプラネス (*Rhodoplanes*) 属、ロドブラム (*Rhodovulum*) 属、ロドミクロビウム (*Rhodomicrobium*) 属、ロネピネラ (*Lonepinella*) 属、ワイセラ (*Weissella*) 属、ワドリヤ (*Waddlia*) 属などに属するものが挙げられる。

10

また、例えば真核微生物に属するイッサチェンキア (*Issatchenkia*) 属、カンジダ (*Candida*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、クロエッケラ (*Kloeckera*) 属、サッカロマイコデス (*Saccharomycodes*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、ジゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、シロバシジウム (*Sirobasidium*) 属、ステリグマトマイセス (*Sterigmatomyces*) 属、スポリドボラス (*Sporidobolus*) 属、スポロボロマイセス (*Sporobolomyces*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、トリゴノプシス (*Trigonopsis*) 属、トルラスポラ (*Torulaspora*) 属、トレメラ (*Tremella*) 属、ナドソニア (*Nadsonia*) 属、ネマトスポラ (*Nematospora*) 属、ハンセニアスポラ (*Hanseniaspora*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、フィプロバシジウム (*Fibulobasidium*) 属、フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属、フィロバシジエラ (*Filobasidiella*) 属、ブレラ (*Bullera*) 属、ブレッタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、ホルターマンニア (*Holtermannia*) 属、マラッセジア (*Malassezia*) 属、メチニコイア (*Metschnikowia*) 属、リボマイセス (*Lipomyces*) 属、ロイコスポリジウム (*Leucosporidium*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodosporidium*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、アカウロペイジ (*Acaulopage*) 属、アクアモルチエレラ (*Aquamortierella*) 属、アセラリア (*Asellaria*) 属、アモエビジウム (*Amoebidium*) 属、アモエボフィルス (*Amoebophilus*) 属、アルンジヌラ (*Arundinula*) 属、ウサロミケス (*Utharomyces*) 属、エキノスポランジウム (*Echinosporangium*) 属、エンテロブ

30

- リウス (Enterobryus) 属、エンドゴネ (Endogone) 属、エントモフトラ  
(Entomophthora) 属、キクセラ (Kickxella) 属、ゲニステロスポラ  
(Genistellospora) 属、コアネフォラ (Choanephora) 属、コエマンシア (Coemansia)  
属、コクロネマ (Cochlonema) 属、コニジオボルス (Conidiobolus) 属、サクセナエア  
5 (Saksenaea) 属、サムニジウム (Thamnidium) 属、サムノセファリス  
(Thamnocephalis) 属、ジスピラ (Dispira) 属、ジマルガリス (Dimargaris) 属、シン  
セファラストルム (Syncephalastrum) 属、シンセファリス (Syncephalis) 属、ズーペ  
イジ (Zoopage) 属、スクレロキスチス (Sclerocystis) 属、スミチウム (Smittium) 属、  
パシジオボルス (Basidiobolus) 属、パラタエニエラ (Parataeniella) 属、パラモエ  
10 ビジウム (Paramoebidium) 属、パラワスキア (Palavascia) 属、ハルペラ (Harpella)  
属、ピプトセファリス (Piptocephalis) 属、ピロボルス (Pilobolus) 属、フィコミケ  
ス (Phycomyces) 属、ブラケスレア (Blakeslea) 属、ヘッセルチネラ (Hesseltinella)  
属、ヘリコケファルム (Helicocephalum) 属、ミコチファ (Mycotypha) 属、ラジオミ  
ケス (Radiomyces) 属、レゲリオミケス (Legeriomyces) 属、ロパロミケス  
15 (Rhopalomyces) 属、アクラシス (Acrasis) 属、アシトステリウム (Acytostelium) 属、  
アルシリア (Arcyria) 属、エキノステリウム (Echinostelium) 属、エキノステリオプ  
シス (Echinosteliopsis) 属、オリゴネマ (Oligonema) 属、カボステリウム  
(Cavostelium) 属、グツリノプシス (Guttulinopsis) 属、クラストデルマ  
(Clastoderma) 属、クリブラリア (Cribraria) 属、コエノニア (Coenonia) 属、コプロ  
20 ミクサ (Copromyxa) 属、コマトリカ (Comatricha) 属、コロデルマ (Colloderma) 属、  
ジアネマ (Dianema) 属、ジクチオステリウム (Dictyostelium) 属、ジジミウム  
(Didymium) 属、ジデルマ (Diderma) 属、ステモニチス (Stemonitis) 属、スラウスト  
キトリウム (Thraustochytrium) 属、セラチオミクサ (Ceratiomyxa) 属、セラチオミ  
クセラ (Ceratiomyxella) 属、トリキア (Trichia) 属、フィサルム (Physarum) 属、ブ  
25 ラスモジオフォラ (Plasmodiophora) 属、フリゴ (Fuligo) 属、ブルスラ (Bursulla) 属、  
プロトステリウム (Protostelium) 属、プロトスポランジウム (Protosporangium) 属、  
ヘミトリキア (Hemitrichia) 属、ペリカエナ (Perichaena) 属、ポリスフォンジリウ  
ム (Polysphondylium) 属、ポリミクサ (Polymyxa) 属、ラビリンツラ (Labyrinthula)  
属、ランプロデルマ (Lamproderma) 属、リコガラ (Lycogala) 属、リセア (Licea) 属、  
30 ワードミケス (Wardmyces) 属、アクチノペルテ (Actinopelte) 属、アステロスポリウ

- ム (*Asterosporium*) 属、アルスリニウム (*Arthrinium*) 属、アルタナリア (*Alternaria*) 属、オイジウム (*Oidium*) 属、クラボスポリウム (*Clabosporium*) 属、クラドボトリウム (*Cladobotryum*) 属、グラフィウム (*Graphium*) 属、コレトトリクム (*Colletotrichum*) 属、スクレロチウム (*Sclerotium*) 属、スタゴノスポラ (*Stagonospora*) 属、スチベラ (*Stibella*) 属、ツベルクラリア (*Tubercularia*) 属、バクトリジウム (*Bactridium*) 属、ピクノスリウム (*Pycnothyrium*) 属、ファエオイサリア (*Phaeoisaria*) 属、ペスタロッチエラ (*Pestalozziella*) 属、リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属、リノクラジエラ (*Rhinocladiella*) 属、レプトスリウム (*Leptothyrium*) 属、アクリオゲトン (*Achlyogeton*) 属、アニソルピジウム (*Anisolpidium*) 属、アルブゴ (*Albugo*) 属、エクトロゲラ (*Ectrogella*) 属、オリピジウム (*Olipidium*) 属、オルピジオプシス (*Olpidiopsis*) 属、カテナリア (*Catenaria*) 属、キトリジウム (*Chytridium*) 属、クラドキトリウム (*Cladochytrium*) 属、コエロモミケス (*Coelomomyces*) 属、ゴナポジア (*Gonapodya*) 属、サプロレグニア (*Saprolegnia*) 属、シロルピジウム (*Sirolpidium*) 属、シンキトリウム (*Synchytrium*) 属、ハリフトロス (*Haliphthoros*) 属、ハルポキトリウム (*Harpochytrium*) 属、ピチウム (*Pythium*) 属、ヒフォキトリウム (*Hyphochytrium*) 属、フィソデルマ (*Physoderma*) 属、フィリクチジウム (*Phlyctidium*) 属、ブラストクラジア (*Blastocladia*) 属、ペロノスポラ (*Peronospora*) 属、ペロノフィトラ (*Peronophythora*) 属、ミクロミコプシス (*Micromycopsis*) 属、メガキトリウム (*Megachytrium*) 属、モノブレファリス (*Monoblepharis*) 属、ラゲニジウム (*Lagenidium*) 属、リジジオミケス (*Rhizidiomyces*) 属、リソジウム (*Rhizidium*) 属、リピジウム (*Rhipidium*) 属、レプトミタス (*Leptomitus*) 属、レプトレグニエラ (*Leptolegniella*) 属、アクレモニウム (*Acremonium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、アブシジア (*Absidia*) 属、アラクニオタス (*Arachniotus*) 属、アルスロボトリス (*Arthrobotrys*) 属、ウロクラジウム (*Ulocladium*) 属、エキノボトリウム (*Echinobotryum*) 属、エクソフィアラ (*Exophiala*) 属、エピコックム (*Epicoccum*) 属、オイジオデンドロン (*Oidiodendron*) 属、オエドセファラム (*Oedocephalum*) 属、オーレオバシジウム (*Aureobasidium*) 属、クルブラリア (*Curvularia*) 属、カンデラブレラ (*Candelabrella*) 属、カンニングハメラ (*Cunninghamella*) 属、ギムノアスカス (*Gymnoascus*) 属、クラドスポリウム

- (Cladosporium) 属、グラフィウム (Graphium) 属、グリオクラジウム (Gliocladium) 属、クリソスポリウム (Chrysosporium) 属、クロメロスポリウム (Chromelosporium) 属、ゲオトリクム (Geotrichum) 属、ゲオミケス (Geomyces) 属、ケトミウム (Chaetomium) 属、ゲニクリフェラ (Geniculifera) 属、ゴナトボトリス (Gonatobotrys) 属、コニオチリウム (Coniothyrium) 属、サーシネラ (Circinella) 属、ジゴリンクス (Zygorhynchus) 属、ジプロジア (Diplodia) 属、シリンドロカーボン (Cylindrocarpon) 属、スコブラリオプシス (Scopulariopsis) 属、スタチボトリス (Stachybotrys) 属、ステンフィリウム (Stemphylium) 属、スポロスリックス (Sporothrix) 属、セペドニウム (Sepedonium) 属、ダクチレラ (Dactylella) 属、タラロミケス (Talaromyces) 属、ドラトミケス (Dratomyces) 属、トリクルス (Trichurus) 属、トリコクラジウム (Trichocladium) 属、トリコセシウム (Trichothecium) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属、トリコフィトン (Trichophyton) 属、ニグロスボラ (Nigrospora) 属、バーチシクラジエラ (Verticicladiella) 属、バーチシリウム (Verticillium) 属、パエシロミケス (Paecilomyces) 属、ピトミケス (Pithomyces) 属、ビボラリス (Bipolaris) 属、ピレノキエタ (Pyrenochaeta) 属、フィアロセファラ (Phialocephala) 属、フィアロフォラ (Phialophora) 属、フォーマ (Phoma) 属、フザリウム (Fusarium) 属、ペスタロチオプシス (Pestalotiopsis) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、ボトリチス (Botrytis) 属、ミクロスポルム (Microsporium) 属、ミロセシウム (Myrothecium) 属、ムコール (Mucor) 属、メモノニエラ (Memnoniella) 属、モナクロスボリウム (Monacrosporium) 属、モニリア (Monilia) 属、モルチエレラ (Mortierella) 属、ユーベニシリウム (Eupenicillium) 属、ユーロチウム (Eurotium) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、レプトグラフィウム (Leptographium) 属、ロビラーダ (Robillarda) 属、アウストロボレトゥス (Austroboletus) 属、アウリクラリア (Auricularia) 属、アウリスカルピウム (Auriscalpium) 属、アガリクス (Agaricus) 属、アグロキベ (Agrocybe) 属、アステロフォナ (Asterophona) 属、アストラエウス (Astraeus) 属、アセロエ (Aseroe) 属、アネルラリア (Anellaria) 属、アマウロデルマ (Amauroderma) 属、アマニタ (Amanita) 属、アルミルラリア (Armillaria) 属、アルミルラリエラ (Armillariella) 属、アレウリア (Aleuria) 属、イスクノデルマ (Ischnoderma) 属、イノキベ (Inocybe) 属、イノノトゥス (Inonotus) 属、イレオディクティオン (Ileodictyon) 属、ウィンネア (Wynnea) 属、ヴェルパ (Verpa) 属、ヴォル

- ヴァリエラ (Volvariella) 属、ウルヌラ (Urnula) 属、エキノドンティウム (Echinodontium) 属、エクシディア (Exidia) 属、エルフヴィンギア (Elfvingia) 属、オウデマンシエルラ (Oudemansiella) 属、オムファリナ (Omphalina) 属、オンニア (Onnia) 属、カタテラスマ (Catathelasma) 属、ガノデルマ (Ganoderma) 属、カマロフィルス (Camarophyllus) 属、カルキポルス (Chalciporus) 属、ガレリナ (Galerina) 属、カロケラ (Calocera) 属、カロストマ (Calostoma) 属、カンタレルス (Cantharellus) 属、カンタレルラ (Cantharellula) 属、キアトゥス (Cyathus) 属、キクロミケス (Cyclomyces) 属、キストデルマ (Cystoderma) 属、キプトトラマ (Cyptotrama) 属、キマトデルマ (Cymatoderma) 属、ギムノピルス (Gymnopilus) 属、キューネロミケス (Kuehneromyces) 属、ギロドン (Gyrodon) 属、ギロポルス (Gyroporus) 属、ギロミトラ (Gyromitra) 属、グエピニア (Guepinia) 属、クサントコニウム (Xanthoconium) 属、クシラリア (Xylaria) 属、クセロコムス (Xerocomus) 属、クセロンファリナ (Xeromphalina) 属、クドニア (Cudonia) 属、クラヴァティア (Clavatia) 属、クラヴァリア (Clavaria) 属、クラヴァリアデルフス (Clavariadelphus) 属、クラヴィコロナ (Clavicornia) 属、クラヴウリナ (Clavulina) 属、クラヴウリノブシス (Clavulinopsis) 属、クラテレルス (Craterellus) 属、クラトルス (Clathrus) 属、クリトキベ (Clitocybe) 属、クリトピルス (Clitopilus) 属、クリニペルリス (Crinipellis) 属、グリフォラ (Grifola) 属、クリプトデルマ (Cryptoderma) 属、クリプトポルス (Cryptoporus) 属、クルキブルム (Crucibulum) 属、クレオロフス (Creolophus) 属、クレピドトゥス (Crepidotus) 属、クロオゴムフス (Chroogomphus) 属、クロロスプレニウム (Chlorosplenium) 属、ゲアストルム (Geastrum) 属、ゲオロッスム (Geolossium) 属、コティリディア (Cotylidia) 属、コノキベ (Conocybe) 属、コバヤシア (Kobayasia) 属、コプリヌス (Coprinus) 属、ゴムフィディウス (Gomphidius) 属、ゴムフス (Gomphus) 属、コリオルス (Coriolus) 属、コルディケプス (Cordyceps) 属、コルティナリウス (Cortinari) 属、コルトリキア (Coltricia) 属、コルリビア (Collybia) 属、サルコスキファ (Sarcoscypha) 属、サルコドン (Sarcodon) 属、サルコドンティア (Sarcodontia) 属、スイルス (Suillus) 属、スキゾフィルム (Schizophyllum) 属、スクアマニタ (Squamanita) 属、スクテルリニア (Scutellinia) 属、スクレロデルマ (Scleroderma) 属、ステレウム (Stereum) 属、ストロビロミケス (Strobilomyces) 属、ストロファリア (Stropharia) 属、スパトゥラ

- リア (Spathularia) 属、スバラッシス (Sparassis) 属、ダエダレオプシス (Daedaleopsis) 属、ダクリオミケス (Dacryomyces) 属、ダルディニア (Daldinia) 属、ディクティオフォラ (Dictyophora) 属、ティロピルス (Tylopilus) 属、ティロミケス (Tyromyces) 属、デスコレア (Descolea) 属、テレフォラ (Thelephora) 属、トゥロストマ (Tulostoma) 属、トラメテス (Trametes) 属、トリコグロッセム (Trichoglossum) 属、トリココマ (Trichocoma) 属、トリコロマ (Tricoloma) 属、トリコロモプシス (Tricholomopsis) 属、トレメルラ (Tremella) 属、トレメルロドン (Tremellodon) 属、ナEMATOTOMA (Naematoloma) 属、ニドゥラ (Nidula) 属、ネオブルガリア (Neobulgaria) 属、バエオスポラ (Baeospora) 属、バクシルス (Paxillus) 属、バッタレア (Battarea) 属、パナエオルス (Panaeolus) 属、パヌス (Panus) 属、パネルス (Panellus) 属、パンケラ (Bankera) 属、ヒグロキベ (Hygrocybe) 属、ヒグロフォルス (Hygrophorus) 属、ヒグロフォロプシス (Hygrophoropsis) 属、ビスポレルラ (Bisporella) 属、ピソリトゥス (Pisolithus) 属、ヒドヌム (Hydnum) 属、ヒドネルム (Hydnellum) 属、ヒプシジグス (Hypsizygus) 属、ピプトポルス (Piptoporus) 属、ヒポキシロン (Hypoxylon) 属、ヒメノカエテ (Hymenochaete) 属、ヒルシオポルス (Hirschioporus) 属、ピルロデルマ (Pyrrhoderma) 属、ファヴォルス (Favolus) 属、ファエオルス (Phaeolus) 属、ファエオレピオタ (Phaeolepiota) 属、ファルス (Phallus) 属、フィストゥリナ (Fistulina) 属、フィルロトプシス (Phyllotopsis) 属、フィルロポルス (Phylloporus) 属、フィロボレトゥス (Filoboletus) 属、フェルリヌス (Phellinus) 属、フォミトプシス (Fomitopsis) 属、フォメス (Fomes) 属、フォリオタ (Pholiota) 属、プサティレルラ (Psathyrella) 属、プシロキベ (Psilocybe) 属、プセウドコルス (Pseudocolus) 属、プセウドヒアトゥラ (Pseudohiatula) 属、プテルラ (Pterula) 属、フランムリナ (Flammulina) 属、プルヴェロボレトゥス (Pulveroboletus) 属、ブルガリア (Bulgaria) 属、ブルテウス (Pluteus) 属、プレウロキベルラ (Pleurocybella) 属、プレウロトゥス (Pleurotus) 属、プレクタニア (Plectania) 属、フロギオティス (Phlogiotis) 属、ベジザ (Peziza) 属、ペニキルリオプシス (Penicillium) 属、ヘベロマ (Hebeloma) 属、ヘリキウム (Hericium) 属、ヘルヴェルラ (Helvella) 属、ポドストロマ (Podostroma) 属、ポリオゼルス (Polyozellus) 属、ポリポルス (Polyporus) 属、ポリポレルス (Polyporellus) 属、ホルターマンニア (Holtermannia) 属、ボルビティウス (Bolbitius) 属、ボルフィレル

ス (Porphyrellus) 属、ボレティヌス (Boletinus) 属、ボレテルス (Boletellus) 属、ボレトウス (Boletus) 属、ボレトブシス (Boletopsis) 属、ポロディスクルス (Porodisculus) 属、ボンダルゼウィア (Bondarzewia) 属、マクロキスティディア (Macrocytidia) 属、マクロポディア (Macropodia) 属、マクロレピオタ (Macrolepiota) 属、マラスミウス (Marasmius) 属、マラスミエルス (Marasmiellus) 属、ミクロポルス (Microporus) 属、ミケナ (Mycena) 属、ミトルラ (Mitrula) 属、ムティヌス (Mutinus) 属、メラノレウカ (Melanoleuca) 属、メルリウス (Merulius) 属、モルケラ (Morchella) 属、ラエティポルス (Laetiporus) 属、ラクタリウス (Lactarius) 属、ラシオスファエラ (Lasiosphaera) 属、ラッカリア (Laccaria) 属、ラマリア (Ramaria) 属、ランプテロミケス (Lampteromyces) 属、リオフィルム (Lyophyllum) 属、リギドポルス (Rigidoporus) 属、リコペルドン (Lycoperdon) 属、リジナ (Rhizina) 属、リスルス (Lysurus) 属、リマケルラ (Limacella) 属、リンデラ (Lindera) 属、ルッスラ (Russula) 属、レウココプリヌス (Leucocoprinus) 属、レウコパクスシルス (Leucopaxillus) 属、レオティア (Leotia) 属、レスピナトゥス (Resupinatus) 属、レッキヌム (Leccinum) 属、レピオタ (Lepiota) 属、レピスタ (Lepista) 属、レンジテス (Lenzites) 属、レントタリア (Lentaria) 属、レンティヌス (Lentinus) 属、レンティヌラ (Lentinula) 属、レンティネルス (Lentinellus) 属、ロジテス (Rozites) 属、ロドキベ (Rhodocybe) 属、ロドトゥス (Rhodotus) 属、ロドフィルス (Rhodophyllum) 属などに属するものが挙げられる。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有する上記微生物は、受託番号で IFO や ATCC などに寄託されており、公知の分譲機関、法人より入手可能である。該微生物として、好ましくは真核微生物、より好ましくは糸状菌に属する微生物が挙げられる。また「97508」として命名され、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、FERM BP-08578 として寄託された微生物を使用してもよい。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法としての一態様は、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有する微生物を栄養培地にて培養し、培養液中に補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生成蓄積せしめこれを採取し、補酵素結合型グルコース脱水素酵素であるタンパク質およびその塩を取得する

ことが挙げられる。

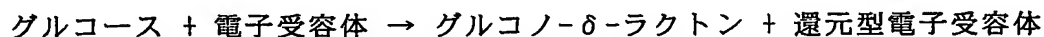
以下、本発明の寄託菌株 FERM BP-08578、該菌株に由来する補酵素結合型グルコース脱水素酵素、および該酵素の取得方法について説明する。

5

#### 1. FERM BP-08578 由来の該酵素の理化学的性質

(1) 作用：国際生化学連合 (IUB) の分類で EC 1.1.99.10 に該当する酵素であり、電子受容体存在下でグルコースの 1 位の水酸基を酸化してグルコノ- $\delta$ -ラク톤を生成する以下の反応を触媒する。

10



本発明においては、電子受容体として例えばフェナジンメトサルフェート、1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェイト、2,6-ジクロロフェノールイン  
15 ドフェノール、フェリシアン化合物などが挙げられ利用できる。

(2) 基質特異性：下記する活性測定方法 1 で D-グルコースおよび他の各基質 (D-セロピオースは 193mM、D-トレハロースおよび D-ラフィノースは 121mM を除き、いずれも終濃度 333mM) を使用した場合の該酵素の相対反応性 (基質特異性) は、表 1 の  
20 様であった。また、終濃度 550mM、100mM の D-グルコースおよびマルトースを使用した場合の相対反応性 (基質特異性) は、表 2 の様であった。D-グルコースには強く作用し、D-マンノース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトール、D-セロピオース、D-トレハロース、マルトース、D-ガラクトース、D-グルコース-6-リン酸、D-フルクトースには弱く作用した。また、L-アラビノース、ラクトース、D-ソルビトール、グ  
25 ルコン酸、スクロース、D-マンニトール、L-ソルボース、D-リボース、L-ラムノース、D-グルコース-1-リン酸、D-ラフィノース、エタノール、グリセロールにはほとんど作用しなかった。

(3) 至適 pH：pH 7.0 から pH 9.0

30

(4) 安定 pH : pH 4.5 から pH 8.5

(5) 至適温度 : 55℃ 付近

5 (6) 温度安定性 : 50℃ 以下で安定である

(7) 分子量 : ゲル濾過法で測定した分子量は約 130kDa であり、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法では約 85kDa であった。

10 (8)  $K_m$  値 : 49.7mM D-グルコース

(9) 等電点 : 等電点電気泳動法で測定した補酵素結合型グルコース脱水素酵素の等電点 (pI) は、約 4.4 であった。

15 (10) 阻害剤 : 下記する活性測定方法 1 に、終濃度 1mM の各添加物を添加し、活性を測定したところ、対照区に対し、各添加物により表 3 の様な阻害効果が認められた。また、下記する活性測定法 1 に、各終濃度の 1, 10-フェナントロリン (メタノールに溶解) を添加したところ表 4 の様な阻害効果が認められた。本酵素の活性は、  
20 重金属イオン ( $Ag^+$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ ) で強く阻害され、1, 10-フェナントロリン、プロフラビン、 $Mn^{2+}$  で 60% 以上阻害された。

(11) 補酵素 : フラビンアデニンジヌクレオチド

25 補酵素結合型グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子の塩基配列に関しても本発明に属する。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造に際し、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素製造に使用される微生物は、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生産可能な生物であればよく、例えば、微生物、好ましくは真核微生物、より好ましくは糸状菌に属する微生物を使用して効率的に製造することができる。

30 特には、「97508」と命名され、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託セ

ンターに、FERM BP-08578 として寄託された微生物を使用してもよい。該寄託菌株は、本発明者らによって土壤中より分離され、その菌学的性質は、下記の通りである。なお、本発明においては、前記菌株の変異株も使用できる。変異株は、紫外線、エックス線などの放射線または化学的変異剤 (NTG など) などの処理によって得られる。

## 2. FERM BP-08578 の菌学的性質

(1) 形態的性質：ポテト・デキストロース寒天培地上で生育した本菌株の光学顕微鏡下での形態的特徴を以下に記述する。菌糸は幅  $2\mu\text{m}$  から  $4\mu\text{m}$ 、規則的な隔壁を有する。菌糸の大半は直線的な生育で、膨化した菌糸はほとんどみられず、分枝を有する。数本の菌糸がより集まり、菌糸束を形成する。菌糸幅はほぼ一定。菌糸の表面は平滑で、壁はやや厚い。気中菌糸基部を中心に結晶体の形成がある。

かすがい連結の形成はみられない。培養 2 週間後までの菌体からは有性・無性生殖器官の形成はみられず、分裂子および厚壁胞子の存在もみられない。

(2) 各培地での生育状態：全ての寒天培地上において菌糸は綿毛状。気中菌糸色調は白色を呈する。ポテト・デキストロース寒天培地培養では淡橙色から橙色の裏面着色を呈する。生育は中程度で、 $25^{\circ}\text{C}$  1 週間培養後のコロニーはポテト・デキストロースおよびオートミール寒天培地で直径  $30\text{mm}$  から  $35\text{mm}$ 、麦芽エキス寒天培地では直径  $37\text{mm}$  から  $38\text{mm}$  であった。また、ポテト・デキストロース寒天培地培養で淡黄色、オートミール寒天培地で薄赤色ないし灰赤色の可溶性色素の産生がみられた。培養 2 週間後までの菌体からは分生子柄などの生殖器官の形成はみられず、滲出液の産生もみられなかった。

(3) 生理的性質：本菌株は、好気性で、ポテト・デキストロース寒天培地において生育至適温度は  $37^{\circ}\text{C}$  付近である。

## 3. FERM BP-08578 の分類学的特徴

以上の性質に基づき寄託菌株である「97508」を、ホークスワース、サットン、エーンズワース編、エーンズワース・アンド・ビスビーズ・ディクショナリー・オブ・ザ・ファンジャイ第7版に従って検索を行った。この検索から該寄託株は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する微生物であることが示された。さらに、  
5 BLAST 相同性検索を行った。ゲノム DNA をテンプレートとして、PCR 法により 18s rDNA フラグメントの増幅を行った後、精製した PCR 産物の配列を解読した。類似の塩基配列を GenBank (GenBank/EMBL/DDBJ 国際 DNA 配列データベース) から検索するため、BLAST (Altschul et al., 1997) による相同性検索を行った結果、該寄託株「97508」は、アスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) であることが判明  
10 した。

本発明における補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法の一態様として、上記の微生物を培養し、微生物菌体内および/または菌体外に該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を発現、もしくは生産させ得る方法が挙げられる。

15

本発明で使用される微生物の培養には、通常の微生物培養用培地が使用でき、炭素源、窒素源、無機物その他使用微生物が必要とする微量栄養素を程よく含有するものであれば、合成培地、天然培地の何れでも使用可能である。炭素源としては、グルコース、シュクロース、デキストリン、澱粉、グリセリン、糖蜜などが使用で  
20 きる。窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機塩類、DL-アラニン、L-グルタミン酸などのアミノ酸類、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、コーンステープリカーなどの窒素含有天然物が使用できる。無機物としては、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第  
25 二鉄などが使用できる。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得るための培養は、通常、振盪培養や通気攪拌などの方法による好氣的条件下で行うのがよく、25℃から60℃、かつ pH 5 より pH 8 の範囲で行うのが好ましい。培養期間は2日から4日の範囲が  
30 好ましい。この様な方法で培養することにより、培養物中、特に培養液中に補酵素

結合型グルコース脱水素酵素を生成蓄積することが出来る。また、本培養方法により、培養微生物内にも補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生成蓄積することが出来る。ついで、培養物中から補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得る方法は、通常の蛋白質の精製方法が使用できる。この方法とは、例えば、微生物を培養後、遠心分離などにより微生物を除き培養上清を得る方法、もしくは、微生物を培養後、培養液を遠心分離して培養微生物を得、適当な方法で該培養微生物を破碎し、破碎液から遠心分離などによって上清液を得る方法である。これらの上清液中に含まれる補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、塩析、溶媒沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの適当な精製操作を組み合わせることによって精製できる。

また、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得るための培養は、固体培地も使用できる。培養方法には特に制限はなく、静置培養によってもよく、培養物を常時混合するような回転培養や流動層培養などによっても行うことができるが、設備投資の少ない培養装置としては静置培養が好ましい。ついで、培養物中から補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得る方法は、通常の蛋白質の精製方法が使用できる。即ち、培養物に水などの抽出剤を加えて攪拌したのち、ふすまなどの培地固形分を遠心分離、濾過などの分離法により除去して抽出液を得ることにより行うことができる。また、菌体内に蓄積された補酵素結合型グルコース脱水素酵素の回収は、上記の抽出液を得た培養物残渣を海砂などの研磨剤とともに磨碎したのち、水などを加えて、菌体から遊離された補酵素結合型グルコース脱水素酵素を抽出する方法などで行うことができる。また、全補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得るには、培養物全体を海砂などの研磨剤とともに磨碎したのち、水などを加えて、菌体から遊離された補酵素結合型グルコース脱水素酵素と培地中に分泌された補酵素結合型グルコース脱水素酵素の両方を一挙に抽出する方法などで行うことができる。これらの上清液中に含まれる補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、塩析、溶媒沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの適当な精製操作を組み合わせることによって精製できる。

また、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、合成による補酵素結合型グルコース脱水素酵素や遺伝子工学によって得られた組換え型の補酵素結合型グルコース脱水素酵素であってもよい。当業者は本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の理化学的性質に由来するタンパク質およびその塩の開示に基づいて容易に補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得ることができる。例えば、補酵素結合型グルコース脱水素酵素については、糸状菌を含む微生物や動植物などの天然物から抽出するほか、そのアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子の塩基配列をもとに合成法によって得ることができるし、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素遺伝子の遺伝子断片を市販の発現ベクターなど公知の発現ベクターに挿入し、得られたプラスミドを使用して大腸菌などの宿主を形質転換し、形質転換体を培養して目的の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得るといった遺伝子工学によって該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を工業的に製造することも可能である。

本酵素の活性測定においては、該酵素を、好ましくは終濃度 0.1-1 unit/ml になるように適宜希釈して用いる。なお、該酵素の酵素活性単位(unit)は 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  のグルコースを酸化する酵素活性である。本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の酵素活性は、次の方法で測定できる。

(i) 酵素活性測定法-1

0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) 1.0ml、1.0M D-グルコース 1.0ml、3mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (以下 DCIP という) 0.1ml、3mM 1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェイト 0.2ml、水 0.65ml を 3ml 石英セル (光路長 1cm) に添加し、恒温セルホルダー付き分光光度計にセットして 37℃ で 5 分間インキュベート後、酵素溶液 0.05ml を添加後、DCIP の 600nm における吸光度変化 ( $\Delta\text{ABS}/\text{min}$ ) を測定する。DCIP の pH7.0 におけるモル吸光係数を  $16.3 \times 10^3 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  とし、1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の DCIP が還元される酵素活性が実質的に該酵素活性 1unit と等価であることから、吸光度変化より該酵素活性を次式に従って求めた。

$$\text{酵素活性 (unit/ml)} = \frac{-\Delta\text{ABS}}{163} \times \frac{3.0}{0.05} \times \text{酵素の希釈率}$$

## (ii) 酵素活性測定法-2

1. 0M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) 3.4  $\mu$ l、1.0M D-グルコース 0.1ml、20mM DCIP 86.6  $\mu$ l を 37℃ で 5 分間インキュベート後、酵素溶液 0.01ml を添加して攪拌し、5 分間反応後 100℃ で 3 分間インキュベートし反応を停止した。さらに 100mM
- 5 グリシン・ナトリウム緩衝液 (pH13.0) 0.19ml、2.0N 水酸化カリウム 0.01ml を添加し 37℃ で 10 分間インキュベートし、溶液中の D-グルコン酸を D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンに変換した後、100mM トリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) 0.39ml、1.0N 塩酸 0.01ml を添加し、pH を中性にした。溶液中の D-グルコン酸を D-グルコン酸/D-グルコノ- $\delta$ -ラクトン定量キット (ベーリンガー・マンハイム社製) により定量した。
- 10 1 分間に 1  $\mu$ mol の D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンを生成する酵素活性が実質的に該酵素活性 1unit と等価であることから、D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンの生成量から該酵素活性を同定した。

- 本発明は、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した物質生産および分析用途の提供に関し、医薬用または食品素材の改質加工への使用に関する。一例として、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を試薬として生体物質を含む該試料中のグルコースの消去方法、測定方法およびそれらの試薬、試薬組成物に使用する。また、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した有機化合物の製造方法および製造原料に使用する。

20

- 本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒する酵素である。本発明では、前記反応に本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用する。補酵素結合型グルコース脱水素酵素としては、限定されるわけではないが、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生産する真核微生物に由来する補酵素結合型グルコース脱水素酵素が好ましく、特に、糸状菌に由来する補酵素結合型グルコース脱水素酵素が好ましい。

- 次に、本発明によって得られた補酵素結合型グルコース脱水素酵素の用途について説明する。補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒する酵素であるから、この反応による変化が利用できる

30

用途であれば、特に制限されない。例えば、補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、生体物質を含む該試料中のグルコースの測定用試薬、消去用試薬へ使用することが可能である。また、医療分野、臨床分野への使用が可能であり、補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した物質生産および分析の用途において使用が可能となる。

5

本発明のバイオセンサは、酵素として本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含む反応層に使用したセンサであればよい。例えば、該バイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法を利用して作用極、その対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体とを含む酵素反応層を形成することによって作製される。このバイオセンサの酵素反応層上に基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これにともなって電子受容体が還元される。酵素反応終了後、還元された電子受容体を電気化学的に酸化させ、このとき、このバイオセンサは得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を測定することが可能である。また、この他に、発色強度或いは pH 変化などを検知する方式のバイオセンサも構築可能である。これらのバイオセンサにより、測定対象物質を基質とする酵素を選択することによって、様々な物質の測定が可能である。例えば、酵素に本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を選択すると、試料液中のグルコース濃度を測定するグルコースセンサを作製することができる。

20

バイオセンサの電子受容体としては、電子の授受能に優れた化学物質を用いることができる。電子の授受能に優れた化学物質とは、一般的に「電子伝達体」、「メディエータ」あるいは「酸化還元媒介剤」と呼ばれる化学物質であり、これらに該当する化学物質として、例えば、特表 2002-526759 に挙げられた電子伝達体や酸化還元媒介剤などを利用してもよい。

25

バイオセンサは、安価なフェリシアン化カリウム（ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム）を電子受容体として用いることが多く、一般に終濃度 1mM 以下で用いられる。しかし本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素はフェリシアン化カリウムを 2-500mM、より好ましくは 30-100mM と高濃度で用いる事で、より感度良く D-グル

30

コースを測定する事が可能である。本発明の測定方法、測定試薬、測定化合物、バイオセンサなどの好ましい態様は、それにかかる測定反応系にフェリシアン化カリウムを終濃度 2-500mM で用いられることを特徴とするものである。

5

### 実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例によって限定されるものではない。以下の実施例における補

10 酵素結合型グルコース脱水素酵素活性の定量は前記の方法に従って行った。

#### 実施例 1

##### 寄託菌株 97508 株の培養

15

グルコース (和光純薬工業社製) 1%、脱脂大豆 (日本食販社製) 2%、コーンステイープリカー (共同商事社製) 0.5%、および硫酸マグネシウム (ナカライテスク社製) 0.1% より成る培地 (pH6.0) 100ml を 500ml 容の培養フラスコに入れ、121℃で 20 分間殺菌し、冷却後、培養フラスコに寄託菌株 97508 株を一白金耳接種し、30℃で 88 時間振盪培養して、該菌株の種培養液とした。前記と同様の組成からなる培地に消泡剤を添加した培地 4L を 5L 容のジャーファーマンターに入れ、121℃で 30 分間殺菌し、冷却後、ジャーファーマンターに前記の種培養液を 40ml 接種し、28℃で 31 時間、通気攪拌の条件で培養して、該菌株の前培養液とした。ついで、前記と同様の組成からなる培地に消泡剤を添加した培地 160L を 200L 容量のジャーファーマンターに入れ、121℃で 20 分間殺菌して冷却したのち、前記の前培養液 1.6L を接種し、28℃で 41 時間、通気攪拌の条件で該菌株を培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して培養上清を回収した。

20

25

#### 実施例 2

30

##### 培養上清からの補酵素結合型グルコース脱水素酵素の単離

以下のステップ 2.1~2.5 により補酵素結合型グルコース脱水素酵素を単離した。

2.1. 濃縮：

実施例 1 の培養上清 160L を限外濾過膜「ペリコン 2 モジュール」(ミリポア社製)

5 で濃縮し、20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) に置換し、粗酵素液を得た。

2.2. Butyl-TOYOPEARL650M(東ソー社製)による精製(第1回)：

前記粗酵素液を、65% 飽和硫酸アンモニウム液 (pH7.5) になるように調整後、遠心分離し上清を得た。65% 硫酸アンモニウムを含む 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) で予め平衡化した Butyl-TOYOPEARL650M カラム (直径 4.7cm×高さ 7.7cm) に、  
10 この粗酵素液を通液して酵素を吸着させた。このカラムを同緩衝液で洗浄したのち、30% 硫酸アンモニウムを含む 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) で酵素を溶出させて活性画分を集めた。さらに、同緩衝液から 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) へのグラジエント溶出法で酵素を溶出させて前記活性画分とあわせた。

2.3. DEAE-セルロファイン A-500 (生化学工業社製)による精製：

15 前記活性画分を限外濾過膜「ペリコン 2 モジュール」で濃縮し、脱塩後 15mM トリス・塩酸緩衝液 (pH8.5) と平衡化させた。同緩衝液で平衡化した DEAE-セルロファイン A-500 カラム (直径 4.7cm×高さ 5.2cm) にこの画分を通液し、溶出液を集めた。

2.4. Butyl-TOYOPEARL650M(東ソー社製)による精製(第2回)：

20 前記溶出液を、65% 飽和硫酸アンモニウム液 (pH7.5) になるように調整後、遠心分離し上清を得た。65% 硫酸アンモニウムを含む 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) で予め平衡化した Butyl-TOYOPEARL650M カラム (直径 4.7cm×高さ 3.6cm) に、この上清を通液して酵素を吸着させた。該カラムを同緩衝液で洗浄したのち、30% 硫酸アンモニウムを含む 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) で酵素を溶出させて  
25 活性画分を集めた。

2.5. TSKgel G3000SW(東ソー社製)による精製：

前記活性画分をペンシル型膜濃縮モジュール「ACP-0013」(旭化成工業社製)で濃縮し、脱塩後 0.2M 塩化ナトリウムを含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH5.5) と平衡化させた。前記緩衝液で平衡化した TSKgel G3000SW(直径 2.15cm×高さ 60cm)  
30 に、この画分を通液し、同緩衝液で酵素を溶出させ活性画分を分取した。活性画分

をセントリプラス 10 (アミコン社製) で濃縮し、脱塩後 50mM クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) に置換した。得られた酵素は、比活性約 1,100unit/mg であり、その精製度は粗酵素液に対し約 170 倍であった。

5

### 実施例 3

#### 補酵素結合型グルコース脱水素酵素の性質試験

上記の実施例 2 によって単離した補酵素結合型グルコース脱水素酵素について、  
10 作用性、至適 pH、安定 pH、至適温度、温度安定性、基質特異性、分子量、阻害剤および補酵素を調べた。

##### 3.1. 作用性：

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を、8.66mM DCIP 存在下で 500mM D-グルコースと反応させ、反応産物を D-グルコン酸/D-グルコノ- $\delta$ -ラクトン定量キットで定  
15 量した。その結果、D-グルコン酸の生成が確認され、これより本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は D-グルコースの 1 位の水酸基を酸化する反応を触媒する酵素であることが明らかになった。

##### 3.2. 至適 pH：

酵素活性測定法-2 の緩衝液を、それぞれクエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液  
20 (pH4.0~5.5)、リン酸カリウム緩衝液 (pH6.5~7.5)、トリス・塩酸緩衝液 (pH8.0~9.0) もしくはグリシン・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH9.5~10.0) (各緩衝液とも終濃度で 17mM) に適宜置き換えて、酵素活性測定法-2 と同様の方法で様々な pH 域における該精製酵素の酵素活性を測定した (図 1)。その結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の至適 pH は、7.0~9.0 であった。

##### 3.3. 安定 pH：

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を、それぞれ 50mM 濃度の緩衝液、すなわちクエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.2~6.4)、リン酸カリウム緩衝液 (pH6.3~6.9)、トリス・塩酸緩衝液 (pH7.3~8.6) およびグリシン・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH9.1~11.4) に溶解し、40℃で 60 分間保持した後に、活性測定方法-1 で酵素活  
30 性を測定し、酵素活性の残存率を分析した (図 2)。その結果、補酵素結合型グル

コース脱水素酵素の安定 pH は、4.5～8.5 であった。

### 3.4. 至適温度：

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を 50mM クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) に溶解し、上記の活性測定方法-1 により 30℃～62℃までの範囲で酵素活性を測定した (図 3)。その結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の至適温度は、55℃付近であった。

### 3.5. 温度安定性：

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を 50mM クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) に溶解し、0℃より 55℃までのいくつかの温度で 15 分間保持したのち、活性測定方法 1 で酵素活性を測定し、酵素活性の残存率を分析した (図 4)。ここで、酵素活性の残存率は、0℃で 15 分間保持した時の酵素活性値を 100%として算出した。その結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、50℃においても 89%の酵素活性が保持され、約 50℃以下で安定であった。

### 3.6. 基質特異性および $K_m$ 値：

活性測定方法-1 における活性測定用反応液の基質を、D-グルコースおよび他の各基質 (いずれも終濃度 333mM、D-セロピオースは 193mM、D-トレハロースおよび D-ラフィノースは 121mM) を使用し、酵素活性測定法-1 に則り該酵素の酵素活性を測定した。該酵素の D-グルコースに対する活性値を 100%として、各基質に対する活性値はそれに対する相対値として表 1 に示した。

また同様に、D-グルコースおよびマルトースについてそれぞれ終濃度 550mM および 100mM の 2 種類を設定し、相対反応性 (酵素活性) を測定した。結果は D-グルコースの値を基準に相対値として表 2 に示した。

これより補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、D-グルコースには強く作用し、D-マンノース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトール、D-セロピオース、D-トレハロース、マルトース、D-ガラクトース、D-グルコース-6-リン酸、D-フルクトースには弱く作用した。また、該酵素は L-アラビノース、ラクトース、D-ソルビトール、グルコン酸、スクロース、D-マンニトール、L-ソルボース、D-リボース、L-ラムノース、D-グルコース-1-リン酸、D-ラフィノース、エタノール、グリセロールにはほとんど作用しなかった。該酵素の  $K_m$  値は、D-グルコースに対し、49.7mM であった。

表 1

基質	相対活性(%)
D-グルコース	100
2-デオキシ-D-グルコース	48
D-キシロース	9.1
D-マンノース	2.8
1,5-アンヒドロ-D-グルシトール	2
D-セロビオース	2
D-トレハロース	1.7
マルトース	1.4
D-ガラクトース	1.2
D-グルコース-6-リン酸	1.1
D-フルクトース	0.86
L-アラビノース	0.1>
ラクトース	0.1>
D-ソルビトール	0.1>
グルコン酸	0.1>
スクロース	0.1>
D-マンニトール	0.1>
L-ソルボース	0.1>
D-リボース	0.1>
L-ラムノース	0.1>
D-グルコース-1-リン酸	0.1>
D-ラフィノース	0.1>
エタノール	0.1>
グリセロール	0.1>

表 2

基質	終濃度 (mM)	相対活性 (%)
D-グルコース	550	100
マルトース	550	2.8
D-グルコース	100	100
マルトース	100	0.5

5

## 3.7. 分子量およびサブユニット分子量：

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を、0.2M NaCl を含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) に溶解し、移動相に同緩衝液を使用して TSKgel-3000SW (直径 10 0.75cm×長さ 60cm、東ソー社製) にて分析した。分子量マーカー (オリエンタル酵母工業社製) を指標にして、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の分子量は約

130kDa であった。12.5% ポリアクリルアミドゲルを使用し Laemmli らの方法 (Nature (1970) 227: 680-685) に従い、この発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に掛けた。泳動後にクマシー・ブリリアント・ブルー染色し、移動度を分子量マーカー (アマシャムファ  
5 ルマシアバイオテク社製) のそれと比較した結果、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素のサブユニット分子量は約 85kDa であった。

### 3. 8. 阻害剤

活性測定方法-1 の反応系に終濃度が 1mM になるように表 3 の各種添加物を阻害剤としてそれぞれ加え、活性測定方法-1 により補酵素結合型グルコース脱水素酵素の活性を測定した。対照区は、表 3 の添加物を加えない以外は活性測定方法-1  
10 に従い行った。該対照区における該酵素活性値を 100% として、それぞれの添加物を加えた場合の相対活性値と対照区との差分を阻害効果 (%) とした。その結果、表 3 に示す阻害効果が認められた。

また、前記の活性測定方法-1 において、それぞれ終濃度が 1mM、5mM、10mM、  
15 25mM および 50mM になるようにメタノールに溶解した 1, 10-フェナントロリンをそれぞれ加え、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の活性を活性測定方法-1 に従い測定した。なお、反応系に対するメタノールはいずれも終濃度 10% (v/v) であった。対照区は、活性測定方法-1 に、終濃度が 10% (v/v) になるようにメタノールを添加して測定を行った。結果を表 4 に示した。その結果、1, 10-フェナントロ  
20 リンによる阻害効果は、1, 10-フェナントロリンが、最終濃度 1mM で 62.0%、5mM で 76%、10mM で 85%、25mM で 91%、50mM で 95% と高かった (表 3)。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素に対する阻害効果は各添加物によって異なり、重金属イオン ( $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Hg}^{2+}$ ) で最も強く、1, 10-フェナントロリン、プロフラビンおよび  $\text{Mn}^{2+}$  で 60% 以上の阻害効果が認められた。

表 3

添加物	阻害効果 (%)	添加物	阻害効果 (%)
なし	0	キナクリン	5.0
NaN <sub>3</sub>	0	トリトンX-100	6.2
ZnCl <sub>2</sub>	0	CoCl <sub>2</sub>	7.0
AlCl <sub>3</sub>	0	リンゴ酸	8.1
安息香酸	0	D-酒石酸	8.5
EDTA	0.4	ヨード酢酸	9.5
CdCl <sub>2</sub>	0.8	システアミン	9.8
LiCl	0.9	2,2'-ビピリジン	10.8
アミノグアニジン硫酸塩	1.1	8-キノリノール	13.9
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.7	KCN	14.5
N-エチルマレイミド	1.8	NiCl <sub>2</sub>	16.5
尿素	1.9	FeCl <sub>3</sub>	25.0
NaCl	2.5	マレイン酸	26.2
チロン	2.5	アクリノール	29.0
BaCl <sub>2</sub>	2.6	2-ニトロ安息香酸	44.3
PbCl <sub>2</sub>	2.7	SnCl <sub>2</sub>	45.5
MgCl <sub>2</sub>	2.8	アクリフラビン	49.0
フマル酸	3.4	1,10-フェナントロリン	62.0
シクロセリン	3.6	プロフラビン	62.0
DL-ベニシラミン	4.3	MnCl <sub>2</sub>	75.5
meso-酒石酸	5.6	AgNO <sub>3</sub>	99.4
クエン酸	5.6	CuCl <sub>2</sub>	100
CaCl <sub>2</sub>	5.7	HgCl <sub>2</sub>	100

表 4

1、10-フェナントロリン終濃度 (mM)	阻害効果 (%)
0	0
50	95
25	91
10	85
5	76

## 3.9. 補酵素：

- 5 本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素溶液に D-グルコースを添加し、吸光分析を行ったところ、385nm および 465nm に認められた吸収極大が該添加により消失したことから、補酵素がフラビンアデニンジヌクレオチドであることが明らかになった。なお、これらの吸収極大は FAD に特有であり、FAD のみ加えない対照反応系を構築した場合に観測されないものであった。

10

## 実施例 4

## グルコースの定量

- 15 前記の実施例 2 で精製した寄託菌株 97508 株由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用し、活性測定方法 1 における 333mM D-グルコースを、0.333 から 33mM の範囲の D-グルコースに代えて使用した場合の吸光度の減少速度を測定した。すなわち D-グルコースの濃度が、0.333mM、0.5mM、1mM、2mM、5mM、6.67mM、10mM、20mM、33mM の各濃度における吸光度変化を測定した。測定結果を図 5 に示す。
- 20 その結果、検量線（相関係数  $r=0.997$ ）が作成できた。これより、補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した D-グルコースの定量が可能であることが示された。

## 実施例 5

## 酵素固定化電極によるグルコースの測定

前記の実施例 2 で精製した寄託菌株 97508 株由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用し、酵素固定化電極による D-グルコースの測定を行った。本酵素 3.4U を固定化したグラッシーカーボン (GC) 電極を用いて、グルコース濃度に対する応答電流値を測定した。電解セル中に、100mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) 2.7ml および 1M ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム (フェリシアン化カリウム) 水溶液 0.3ml を添加した。GC 電極をポテンショスタット BAS100B/W (BAS 製) に接続し、40℃、アルゴン飽和、酸素飽和、空気飽和、各条件下で溶液を攪拌し、銀塩化銀参照電極に対して +500mV を印加した。これらの系に 1M D-グルコース溶液を 30 $\mu$ l 添加し、定常状態の電流値を測定した。更に同量の 1M D-グルコース溶液を添加し電流値を測定するという作業を、各々 3 回繰り返した。この電流値を既知のグルコース濃度 (約 10、20、30、40mM) に対してプロットしたところ、検量線が作成できた (図 6)。これより本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した酵素固定化電極でグルコースの定量が可能であることが示された。さらに、気体の飽和条件によらず検量線が一致したことにより、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素が酸素に対して極めて不活性であること、および該酵素を利用した酵素固定化電極で、酸素の影響を受けずに、D-グルコースを定量可能であることが示された。

20

## 実施例 6

## 酵素固定化電極による標準血清中のグルコースの測定

実施例 5 に準じた方法で、酵素固定化電極によりコントロール血清 I ワコー B (和光純薬製) を用いて、血清中のグルコース濃度の測定を行った。電解セル中に、100mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) 2.4ml および 1M ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム (フェリシアン化カリウム) 水溶液 0.3ml を添加し、電流値が定常状態になったところで、血清を添加し電流値を測定した。同様にして既知濃度の D-グルコース溶液を用いて測定を行い、検量線を作成した。該血清中のグルコース濃度は、

30

検量線法により 4.5mM と同定され、これはヘキソキナーゼ・グルコース-6-リン酸脱水素酵素法で同定した該血清中のグルコース濃度と一致した。これより本発明で用いた補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した酵素固定化電極で、血清中のD-グルコースが定量可能であることを示された。

5

### 産業上の利用可能性

本発明によって、マルトースへの作用性が 5%以下であり、1, 10-フェナントロリンで阻害される、可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の提供が可能となった。さらには工業的生産に適した該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法、その為の生産微生物が提供される。これによって、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の産業的用途への応用が可能となり、詳細には、マルトースを成分とする輸液を投与した糖尿病患者の血糖値をも正確に測定可能となった。また、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用することで、グルコースセンサにおいても微量のグルコースが測定可能で、かつ利用可能となった。また、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した試料中のグルコースの測定方法、消去方法、有機化合物の製造方法などを含む物質生産および分析の用途において使用が可能となり、医薬、臨床分野および食品分野での素材の改質加工に使用可能であるなど、利用価値

10

15

20

の高い酵素の提供が可能となった。

## 請求の範囲

1. 電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が低いことを特徴とする可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

5

2. 電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が 5%以下であり、1, 10-フェナントロリンで阻害されることを特徴とする請求項 1 記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

10 3. 終濃度 1mM の 1, 10-フェナントロリンで 50%以上阻害されることを特徴とする請求項 1 ないし 2 記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

4. 補酵素がフラビン化合物であることを特徴とする請求項 1 より 3 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

15

5. グルコースの 1 位の水酸基を酸化することを特徴とする請求項 1 より 4 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

20 6. 微生物由来である請求項 1 より 5 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

7. 真核微生物由来である請求項 6 に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

25 8. アスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) 由来である請求項 7 に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

9. 受託番号 FERM BP-08578 のアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) 由来である請求項 8 に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

30 10. 請求項 1 より 5 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の

性質または実質的に同等な性質を有するタンパク質であって、該タンパク質をコードするアミノ酸配列あるいは当該配列に 1 またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、置換もしくは付加による変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的に活性で安定なタンパク質であることを特徴とする補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

5

11. 請求項 1 より 5 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有することを特徴とする微生物。

12. 真核微生物である請求項 11 に記載の微生物。

10

13. アスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) である請求項 12 に記載の微生物。

15

14. 受託番号 FERM BP-08578 のアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) である請求項 13 の微生物。

20

15. 請求項 1 より 5 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法であって、請求項 11 より 14 のいずれか 1 項に記載の微生物を培養し、培養により補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生成せしめ、これを採取することを特徴とする補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法。

16. 請求項 1 より 10 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用することを特徴とするグルコースの測定方法。

25

17. 使用に際し、フェリシアン化物を終濃度 2mM-500mM で用いることを特徴とする請求項 16 記載の測定方法。

18. 請求項 1 より 10 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有することを特徴とするグルコース測定試薬組成物。

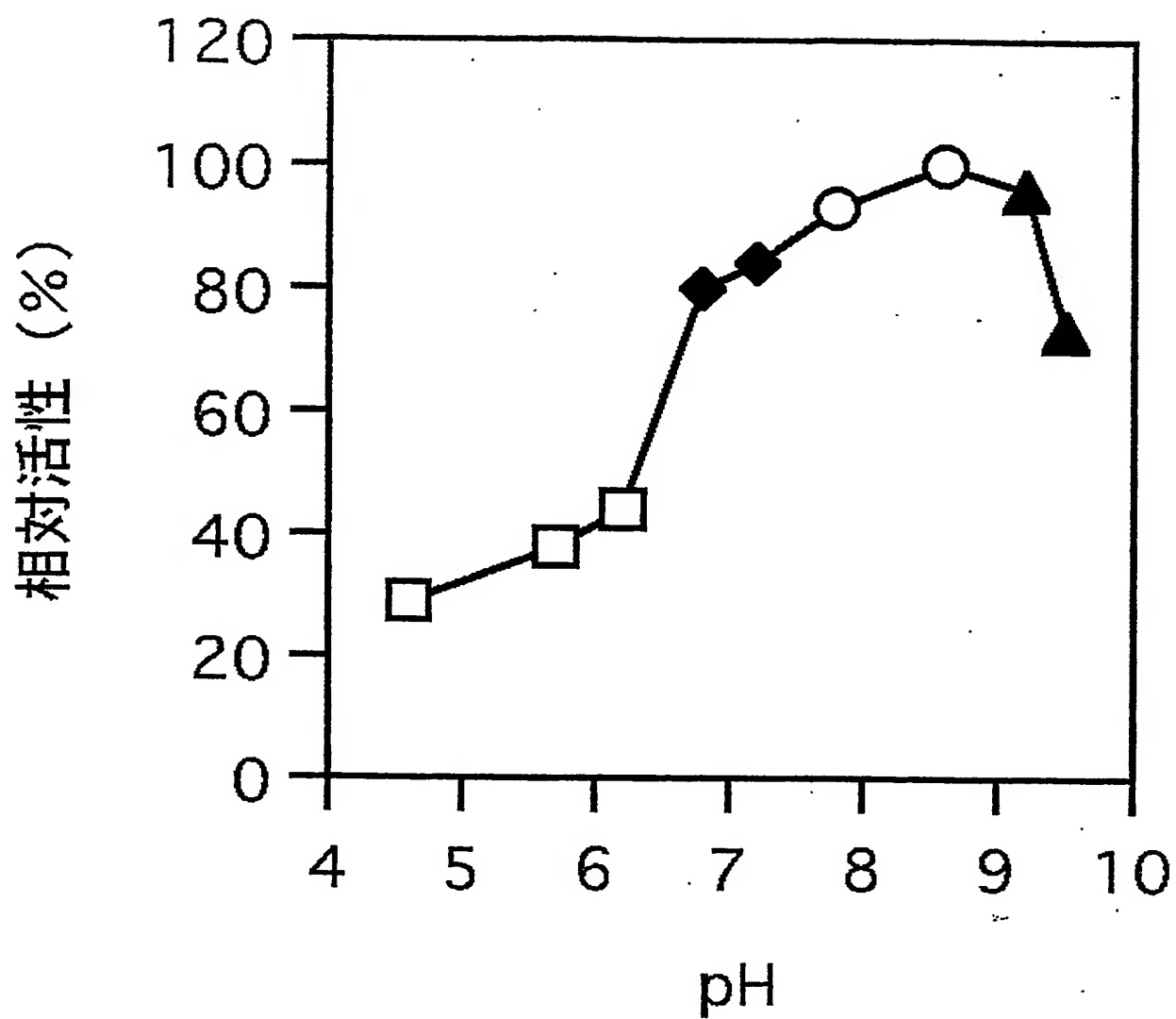
30

19. 使用に際し、フェリシアン化物を終濃度 2mM-500mM で用いることを特徴とする請求項 18 記載の測定試薬組成物。

20. 請求項 1 より 10 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素  
5 を使用することを特徴とするグルコース測定用のバイオセンサ。

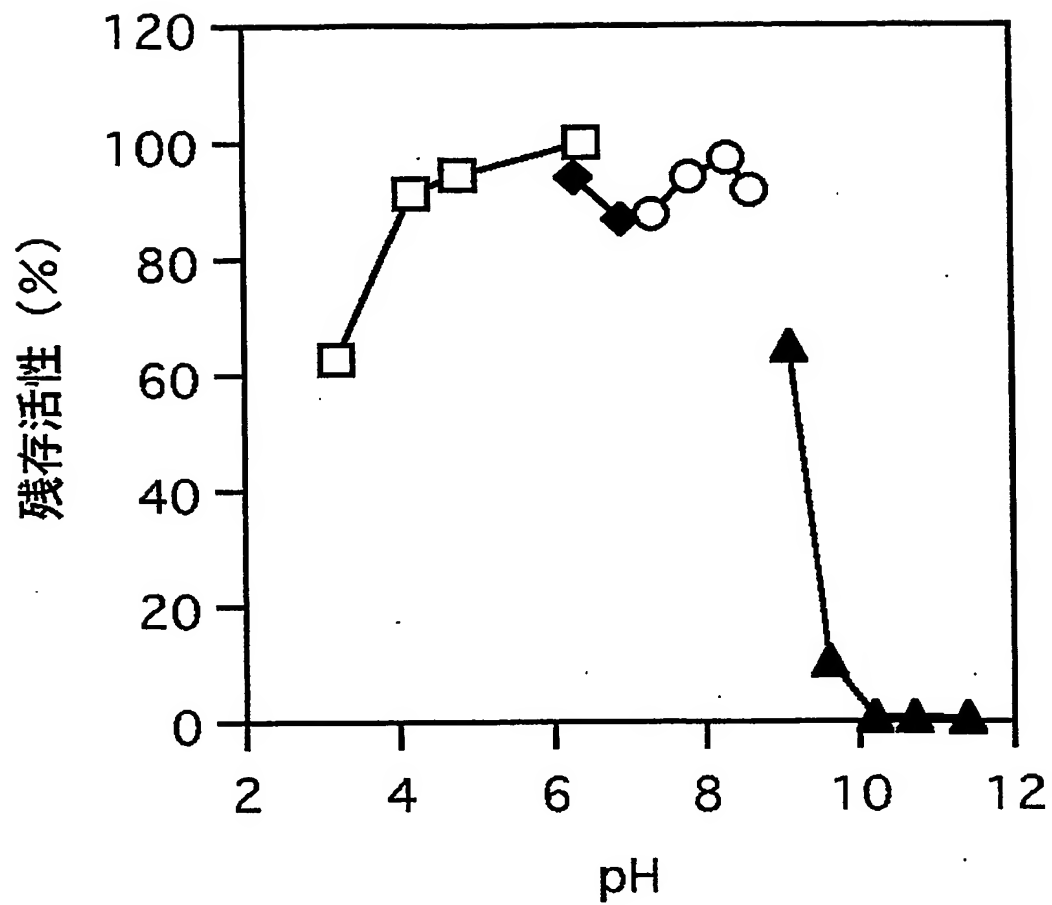
21. 使用に際し、フェリシアン化物を終濃度 2mM-500mM で用いることを特徴とする請求項 20 記載のバイオセンサ。

1/6  
図 1



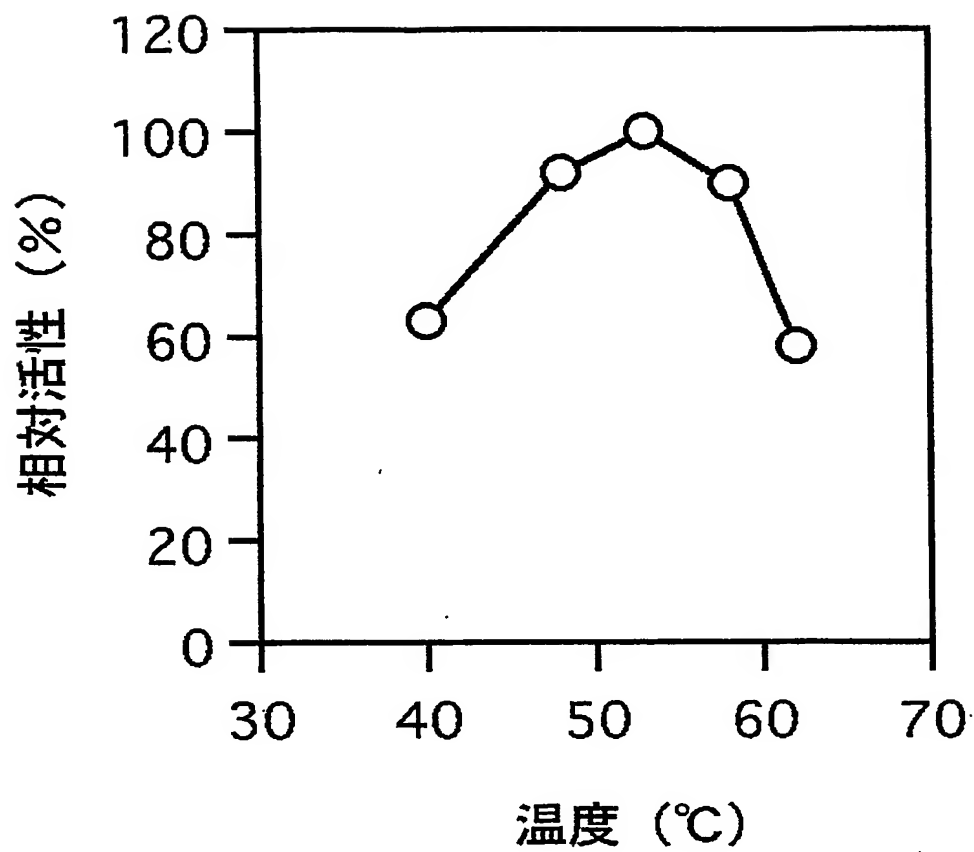
2/6

☒ 2



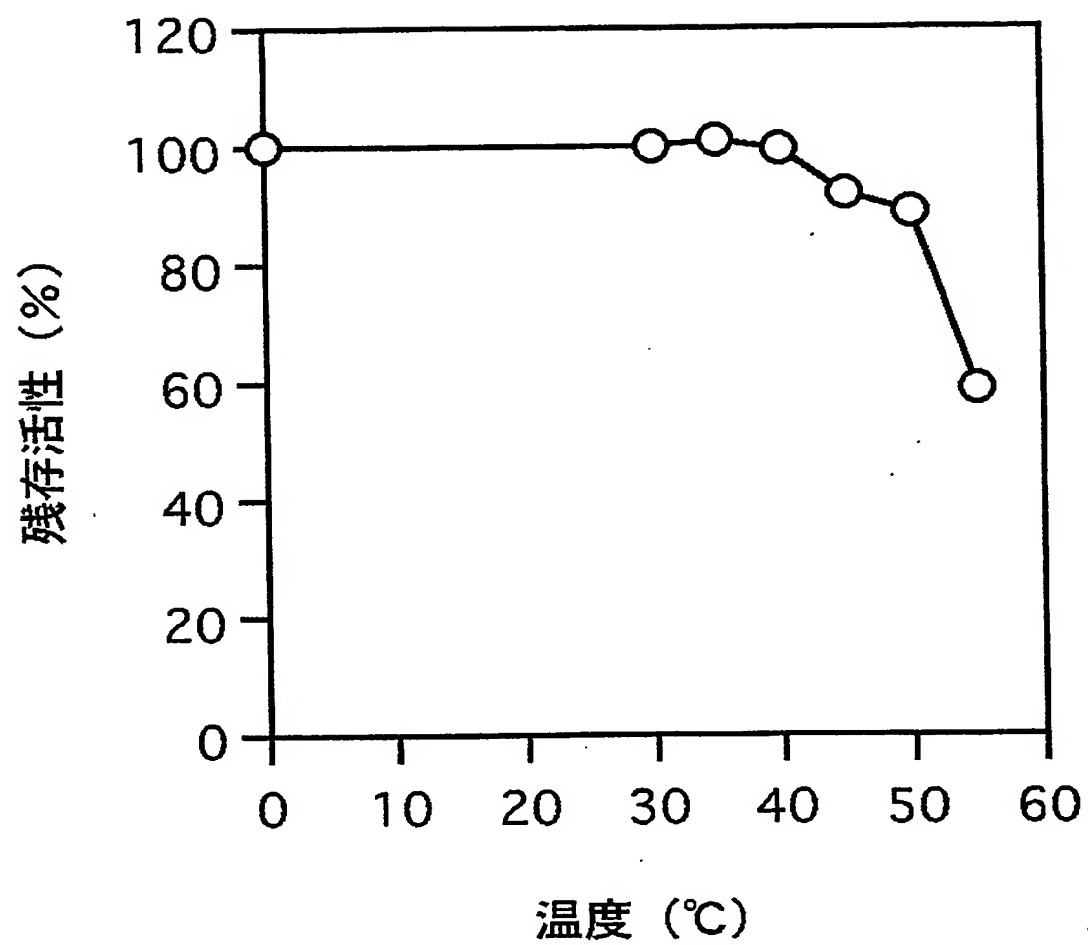
3/6

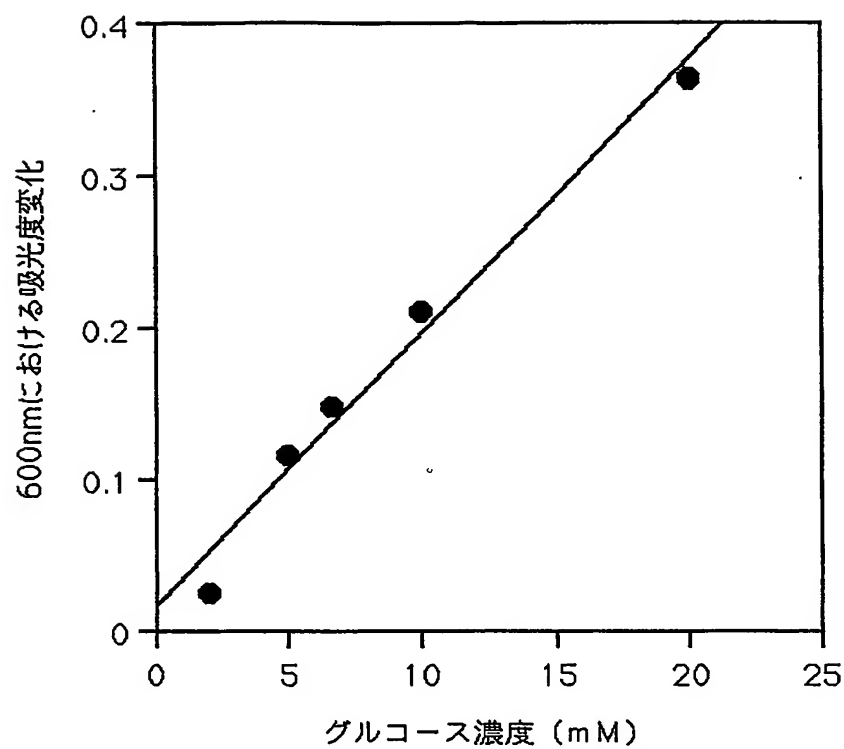
☒ 3

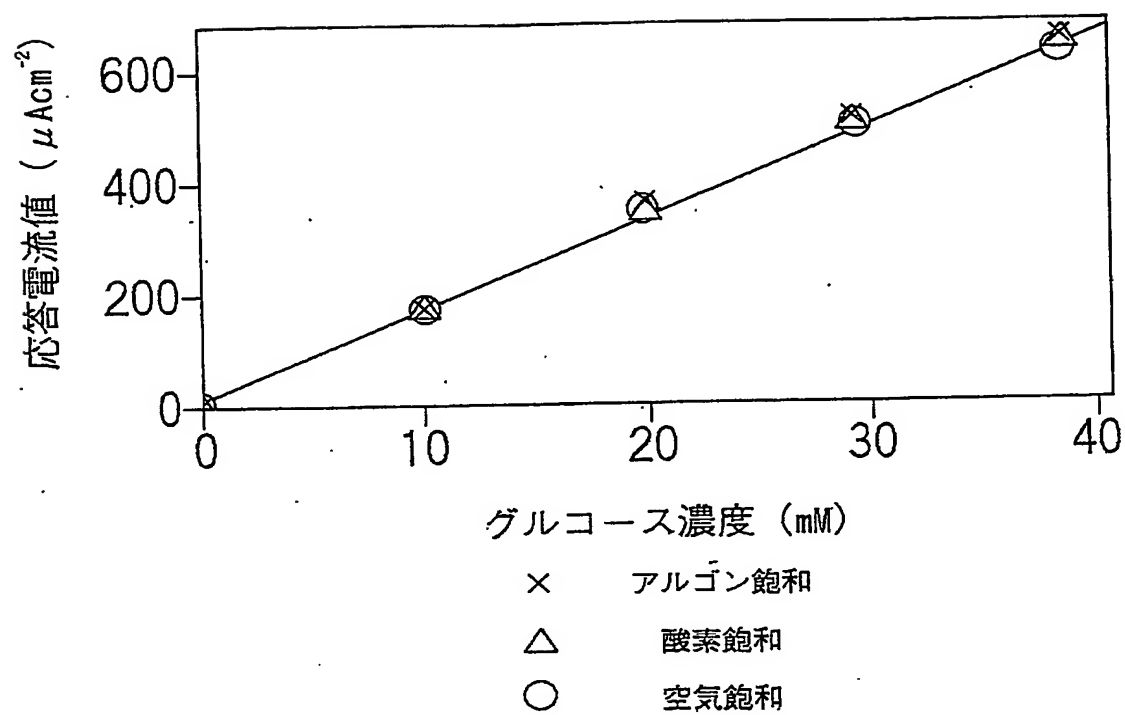


4/6

図 4



5/6  
図 5

6/6  
図 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16603

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.C1<sup>7</sup> C12N9/02, C12Q1/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.C1<sup>7</sup> C12N9/02, C12Q1/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 2001-346587 A (Hiroshi HAYADE), 18 December, 2001 (18.12.01), (Family: none)	<u>1, 5, 6, 10-12,</u> <u>15-21</u> 2-4, 7-9, 13, 14
A	JP 10-243786 A (Hiroshi HAYADE), 14 September, 1998 (14.09.98), & US 6103509 A	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 March, 2004 (10.03.04)

Date of mailing of the international search report  
23 March, 2004 (23.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N9/02, C12Q1/54

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N9/02, C12Q1/54

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — A	JP 2001-346587 A (早出広司) 2001. 12. 18 (ファミリーなし)	1, 5, 6, 10-12, 15-21 2-4, 7-9, 13, 14
A	JP 10-243786 A (早出広司) 1998. 09. 14 & US 6103509 A	1-21

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 03. 2004

国際調査報告の発送日

23. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448